



Cíntia Catarina Sousa Carreira

Licenciada em Bioquímica

O operão da proteína laranja: novas proteínas envolvidas na divisão celular em bactérias redutoras de sulfato

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Doutora Marta Sofia Peixe Carepo,
Investigadora Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientadora: Doutora Raquel Eliana Lourenço Grazina,
Post-Doc, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro

Arguente: Doutora Teresa Sacadura Santos Silva

Vogal: Doutora Marta Sofia Peixe Carepo



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2012

Cíntia Catarina Sousa Carreira

Licenciada em Bioquímica

**O operão da proteína laranja: novas
proteínas envolvidas na divisão celular em
bactérias redutoras de sulfato**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Doutora Marta Sofia Peixe Carepo,

Investigador Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientadora: Doutora Raquel Eliana Lourenço Grazina,

Post-Doc, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro

Arguente: Doutora Teresa Sacadura Santos Silva

Vogal: Doutora Marta Sofia Peixe Carepo

Setembro 2012

Direitos de Cópia

O operão da proteína laranja: novas proteínas envolvidas na divisão celular em bactérias redutoras de sulfato

Cíntia Catarina Sousa Carreira

FCT/UNL

UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de expressar um especial e sincero agradecimento à Dra. Marta Carepo e à Dra. Raquel Grazina por orientarem esta dissertação e por me transmitirem conhecimentos que em muito contribuíram para ampliar a minha formação científica. Obrigada por toda a amizade, apoio, paciência, e motivação para superar todas as dificuldades e desafios que encontrei na realização deste projecto de mestrado.

Agradeço à professora Isabel Moura e ao professor José Moura por me terem acolhido nos seus laboratórios, por todo o seu apoio e paixão contagiante pela Ciência.

À Dra. Patrícia Paes de Sousa agradeço toda a sua disponibilidade, ajuda e entusiasmo com as experiências de electroquímica e à Dra. Sofia Pauleta por toda a ajuda nas experiências de RMN.

Gostaria de mostrar a minha gratidão a todos os membros do grupo *Bioin* e *Bioprot* por toda a amizade, boa disposição e pelo bom ambiente de trabalho que me proporcionaram. Em particular agradeço aos meus colegas Catarina, Natália, Iris, Cecília, Susana, Cláudia, Leonardo e Jacopo pela amizade, ajuda no laboratório, conselhos e discussões científicas.

Um agradecimento especial à Diana Freire por todo o carinho, alegria e força de viver que transmite. Obrigada por todo o teu apoio e amizade.

Por fim, quero expressar a minha profunda gratidão aos meus amigos mais próximos e família. Em especial aos meus pais e à minha irmã, por todo o seu amor, carinho, compreensão e paciência. Embora não tenha palavras suficientes para descrever toda a minha gratidão, agradeço-vos o apoio incondicional, os valores que sempre me transmitiram e tudo o que fizeram para que eu pudesse terminar este ciclo de estudos.

Resumo

O operão da proteína laranja (ORP-*ORange Protein*) é composto por genes que codificam para proteínas envolvidas na divisão celular de microorganismos anaeróbios e em particular de bactérias redutoras de sulfato.

A ORP isolada de *Desulfovibrio gigas* possui um centro heterometálico único de Mo-Cu, coordenado por enxofres, do tipo $[S_2MoS_2CuS_2MoS_2]^{3-}$. Neste trabalho realizou-se a purificação e caracterização bioquímica da ORP de *D. alaskensis* G20 expressa heterologicamente em *E.coli*. A ORP recombinante foi isolada na forma apo e foi possível reconstituir o seu centro metálico, incubando a proteína com tetratiomolibdato e cloreto de cobre na razão 2Mo:1Cu. Para compreender os mecanismos de formação do centro metálico foram realizadas titulações de UV-Visível com $(NH_4)_2MoS_4$ e $CuCl_2$ na presença/ausência da proteína. Os resultados obtidos mostram que a proteína favorece a estequiometria de 2Mo:1Cu. Na ausência desta a estequiometria de reacção é de 1Cu:0,6Mo. Esta observação permitiu concluir que o centro metálico é formado numa síntese assistida pela proteína.

No operão da ORP encontram-se agrupados dois genes que codificam para duas ATPases conservadas. A pesquisa efectuada na base de dados do NCBI revelou que estas ATPases possuem domínios do tipo *MinD*, observados em proteínas que participam na divisão celular em *E.coli*, bem como domínios de ligação a centros do tipo [Fe-S].

Neste trabalho realizou-se a expressão homóloga da ATPase DVU2103 em *D. vulgaris* Hildenborough. Esta proteína foi co-purificada com a ORP, o que indica a formação de um complexo com significado fisiológico. O espectro de UV-Visível adquirido apresentou uma banda alargada a 400 nm, característica da presença de centros [Fe-S]. O coeficiente de extinção molar determinado por proteína, $\epsilon_{400\text{ nm}} = 32600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, bem como os resíduos de cisteínas identificados na sequência de aminoácidos sugerem a presença de dois centros [4Fe-4S], que se revelaram sensíveis ao oxigénio.

Termos Chave

Desulfovibrio • Operão ORP • Proteína laranja • Molibdénio • ATPases • Centros [Fe-S]

Abstract

The Orange protein (ORP) operon encodes several proteins involved in cell division of anaerobic microorganisms, in particular in sulfate reducing bacteria.

EXAFS studies revealed the presence of quite unique mixed metal sulfur cluster $[S_2MoS_2CuS_2MoS_2]^{3-}$ in the ORP isolated from *Desulfovibrio gigas*. In this Master thesis the recombinant ORP from *D. alaskensis* G20 was cloned, purified and biochemically characterized. The protein was obtained in the apo form and it was possible to reconstitute the holo-protein metal cluster, incubating the protein with tetrathiomolybdate and copper chloride in a 2Mo:1Cu ratio. In order to get insights on the metal cluster formation, UV-Visible titrations were performed using $(NH_4)_2MoS_4$ and $CuCl_2$ in the presence/absence of protein. The results obtained have showed the protein favors the 2Mo:1Cu stoichiometry. In the absence of apo-ORP the reaction stoichiometry between molybdenum and copper is 1Cu:0.6Mo. These observations allowed the conclusion that the metal cluster synthesis is assisted by the protein.

In the ORP operon there are two genes encoding two conserved ATPases. Research at the NCBI data bases revealed the presence of *MinD* type domains, observed in proteins that participate in *E. coli* cell division, as well as [Fe-S] binding domains.

In this thesis the homologous expression of DVU2103 ATPase in *D. vulgaris* Hildenborough was achieved. This protein co-purifies with the ORP indicating that a complex with physiological meaning is formed between these proteins. UV-Visible spectrum has showed a broad band at 400 nm characteristic of [Fe-S] clusters. The molar extinction coefficient per protein was obtained, $\epsilon_{400\text{ nm}} = 32600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. This result together with the conserved cysteine residues identified in the aminoacid sequence suggests the presence of two [4Fe-4S] clusters. These clusters have proven to be oxygen sensitive.

Key Words

Desulfovibrio • ORP operon • Orange protein • Molybdenum • ATPases • [Fe-S] clusters

Índice de matérias

Índice de figuras	IX
Índice de tabelas.....	XIII
Abreviaturas.....	XV
1. Introdução	1
1.1. Molibdénio.....	1
1.2. Tetratiomolibdato	2
1.3. Relevância biológica do molibdénio	4
1.4. Proteínas contendo molibdénio	6
1.5. Proteína laranja (ORP)	7
1.6. Operação da ORP de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	10
1.7. Sistema <i>Min</i> de <i>E.coli</i>	13
1.8. Centros [Fe-S].....	16
2. Objectivos	19
3. Materiais e Métodos	21
3.1. Proteína laranja de <i>D. alaskensis</i> G20	21
3.1.1. Sequenciação do DNA e expressão heteróloga da ORP em <i>E.coli</i>	21
3.1.2. Purificação da ORP.....	23
3.1.3. Determinação do coeficiente de extinção molar	25
3.1.4. Sequência do N-terminal da ORP	26
3.1.5. Determinação da massa molecular	26
3.1.6. Reconstituição do centro metálico da ORP	27
3.1.7. Titulações de UV-Vis da apo-ORP com Mo e Cu.....	28
3.2. Operação ORP de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	28
3.2.1. Análise bioinformática do Operação	28
3.2.2. Expressão homóloga das ATPases de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough	28
3.2.3. Purificação sob atmosfera aeróbia e anaeróbia	30
3.2.4. Caracterização Bioquímica	32
4. Resultados e Discussão	35

4. 1. Proteína laranja de <i>Desulfovibrio alaskensis</i> G20	35
4.1.1. Expressão heteróloga da ORP em <i>E.coli</i>	37
4.1.2. Purificação da ORP	38
4.1.3. Determinação do coeficiente de extinção molar da ORP.....	41
4.1.4. Sequência do N-terminal da ORP recombinante	42
4.1.5. Determinação da massa molecular	42
4.1.6. Reconstituição do centro metálico da ORP	44
4.1.7. Formação do centro metálico da ORP	48
4.2. Análise do Operão ORP de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough.....	52
4.2.1. Expressão homóloga das ATPases de <i>D. Vulgaris</i> Hildenborough	55
4.2.2. Purificação das ATPases em aerobiose	57
4.2.3. Purificação e caracterização das ATPases em anaerobiose	58
5. Considerações finais e perspectivas futuras.....	65
6. Bibliografia	67

Índice de figuras

Figura 1.1. Representação da estrutura dos tiomolibdatos.	3
Figura 1.2. Espectros UV-Vis do molibdato e tiomolibdatos.	3
Figura 1.3. Representação da estrutura $[(\text{HSCu})_3\text{S}_4\text{Mo}]^{2-}$	5
Figura 1.4. Classificação das proteínas contendo Mo de acordo com as suas características funcionais e tipo de centro.	6
Figura 1.5. Estrutura do centro metálico da ORP de <i>Desulfovibrio gigas</i>	8
Figura 1.6. Estrutura da forma apo da ORP de <i>Desulfovibrio gigas</i>	9
Figura 1.7. Representação esquemática da disposição dos genes no operão da ORP em <i>D. vulgaris</i> Hildenborough e proteínas codificadas por esse operão.	12
Figura 1.8. Representação esquemática dos mecanismos regulatórios do operão ORP em <i>D. vulgaris</i> Hildenborough.	12
Figura 1.9. Interações moleculares entre as proteínas Min e a membrana.	14
Figura 1.10. Dinâmica do sistema Min em <i>E.coli</i>	15
Figura 1.11. Estrutura dos centros Fe-S.	16
Figura 3.1. Vector de sobreexpressão pET-ORP (5,8 kb).	22
Figura 3.2. Esquema do processo de purificação da ORP recombinante.	24
Figura 3.3. Representação da curva de calibração correspondente às absorvâncias das soluções padrão BSA obtidas em função da sua concentração.	25
Figura 3.4. Esquema do processo de purificação das ATPases de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough.	32
Figura 3.5. Representação da curva de calibração correspondente às absorvâncias das soluções padrão de BSA obtidas em função da sua concentração.	33
Figura 4.1. Alinhamento da sequência da ORP de <i>D. alaskensis</i> G20 (Dde_3198) com as ORPs de <i>D. africanus</i> Walvis Bay, <i>D. vulgaris</i> Hildenborough, <i>Pelobacter thermopropionicum</i> SI, <i>D. gigas</i> e <i>Methanohalobium evestigatum</i> Z-7303.	36
Figura 4.2. Esquema representativo da disposição dos genes no operão da ORP em <i>D. alaskensis</i> G20.	37
Figura 4.3. Perfil de expressão de ORP por SDS-PAGE.	38
Figura 4.4. Perfil cromatográfico da ORP eluída numa coluna Superdex 75 XK26 (GE).	38
Figura 4.5. Perfil cromatográfico da eluição da ORP, utilizando a coluna Source 15Q.	39
Figura 4.6. Análise SDS-PAGE das etapas de purificação da ORP de <i>D. desulfuricans</i> G20.	40

Figura 4.7. Espectro UV-Vis da ORP recombinante de <i>D. alaskensis</i> G20 em 50 mM Tris-HCl pH 7,6.	41
Figura 4.8. Alinhamento da sequência de aminoácidos da ORP com a sequência do N-terminal obtido pela degradação de Edman.	42
Figura 4.9. Recta de calibração, obtida a partir do kit comercial de calibração de filtração em gel <i>LMW</i> (<i>Ge Healthcare</i>) [92], com a equação, $K_{av} = -0,3557 (\log MM) + 1,8177$, $R^2 = 0,992$	43
Figura 4.10. Espectro UV-Vis da proteína laranja reconstituída em 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,6. <i>Insert</i> : espectro da ORP nativa em 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,6.	44
Figura 4.11. Curva de calibração de K_{av} em função do $\log MM$ com a equação, $K_{av} = -0,327(\log MM) + 1,744$, $R^2 = 0,991$	47
Figura 4.12. Titulação UV-Vis de 25 μM de apo-proteína em 50 mM Tris-HCl, 20% DMF a pH 7,6, na presença de cloreto de cobre na razão 1:1, utilizando o TTM como titulante. <i>Insert</i> : Espectros das adições de TTM em diferentes estequiometrias.	48
Figura 4.13. Perfil das absorvâncias corrigidas a 338 nm, da apo-proteína incubada na presença de cloreto de cobre, titulada com TTM.	49
Figura 4.14. Titulação UV-Vis de 25 μM de cloreto de cobre com tetratimolibdato de amónia em 50 mM Tris-HCl, 20% DMF a pH 7,6. <i>Insert</i> : Espectros das adições de TTM em diferentes estequiometrias.	50
Figura 4.15. Titulação UV-Vis de 25 μM da apo-proteína em 50 mM Tris-HCl, 20% DMF a pH 7,6, na presença de tetratimolibdato de amónia na razão 2:1, utilizando cloreto de cobre (II) como titulante. <i>Insert</i> : Espectros das adições de $CuCl_2$ em diferentes estequiometrias.	51
Figura 4.16. Perfil das absorvâncias a 338 nm, obtidas a partir da titulação da ORP incubada com TTM (2Mo:1ORP) e titulada com cloreto de cobre.	52
Figura 4.17. Alinhamento da sequência da proteína DVU2103 com a sequência de DVU2104 de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough.	53
Figura 4.18. Curva de crescimento de <i>D. vulgaris</i> Hildenborough em meio <i>Postgate C</i> , durante 60 h.	55
Figura 4.19. Perfil de expressão das proteínas DVU2103, DVU2104, e DVU2105 por SDS-PAGE	56
Figura 4.20. Gel SDS-PAGE após purificação por cromatografia de afinidade (IMAC).	57
Figura 4.21. Géis de poliacrilamida obtidos após purificação anaeróbia por cromatografia de afinidade.	58
Figura 4.22. Espectro UV-Vis da fracção das ATPases em Tris-HCl 20 mM pH 7,6 obtido após purificação por cromatografia de afinidade.	60
Figura 4.23. Gel SDS-PAGE após purificação por cromatografia aniónica.	61

Figura 4.24. Espectro UV-Vis da ATPase DVU2103 em Tris-HCl 20 mM pH 7,6 após o último passo de purificação.....	62
Figura 4.25. Sequência de aminoácidos da proteína DVU2103..	63

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Motivos de ligação aos centros [4Fe-4S] encontrados em diversas proteínas.	17
Tabela 3.1. <i>Primers</i> utilizados para a sequenciação do gene da ORP das células de <i>D. alaskensis</i> G20.	22
Tabela 3.2. Composição do meio Postgate C.....	30
Tabela 4.1. Determinação da massa molecular da ORP por diferentes metodologias (SDS-PAGE, espectrometria de massa e filtração em gel).	43
Tabela 4.2. Razão das absorvâncias máximas obtidas para a ORP nativa de <i>D. gigas</i> e de <i>D. alaskensis</i> G20 e para a ORP recombinante de <i>D.alaskensis</i> G20 expressa em <i>E. coli</i>	45
Tabela 4.3. Quantificação da proteína total reconstituída, através do método BCA e dos metais molibdénio e cobre por ICP.	46
Tabela 4.4. Valores dos coeficientes de extinção molares experimentais das ORPs nativas de <i>D. gigas</i> e de <i>D. alaskensis</i> G20 e da ORP de <i>D. alaskensis</i> G20 recombinante.	46
Tabela 4.5. Domínios identificados nas sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes do operão da ORP.	54
Tabela 4.6. Massa molecular e pI das proteínas codificadas pelos genes do operão da ORP em <i>D. vulgaris</i> Hildenborough, obtidas através do programa <i>ProtParam</i> (<i>ExPASy</i>).	54
Tabela 4.7. Identificação das proteínas co-eluídas com a proteína DVU2103-His-tag utilizando o <i>MASCOT search engine</i>	59
Tabela 4.8. Identificação por Maldi-Tof-MS das proteínas eluídas na etapa de purificação com a <i>Resource Q</i>	62

Abreviaturas

Ø	Diâmetro
Abs	Absorvância
BCA	Ácido bicinconínico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
c.d.o.	Comprimento de onda
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
CHYP	Proteína hipotética conservada
PROsite	<i>Database of protein domains, families and functional sites</i>
COG	<i>Cluster of groups of orthologous proteins</i>
D.	<i>Desulfovibrio</i>
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DW	Doença de Wilson
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EBP	<i>Enhancer binding activator protein</i>
EPR	Ressonância Paramagnética Electrónica (do inglês, <i>Electron Paramagnetic Resonance</i>)
EXAFS	<i>Extended X-ray absorption fine structure</i>
Fds	Ferredoxinas
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês, <i>Green Fluorescent Protein</i>)
HiPIP	Proteínas de ferro de elevado potencial
HYP	Proteína hipotética
ICP	Plasma de acoplamento indutivo (do inglês, <i>Induced Coupled Plasma</i>)
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactósido
Kav	Coefficiente de partição entre as fases cromatográficas
MPT	Molibdopterina
MRP	Multi-resistência e adaptação ao pH
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	Ressonância magnética nuclear (do inglês, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
OD₆₀₀	Densidade óptica a 600nm
ORP	Proteína laranja
PAS	Domínio Per-Arnt-Sim
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluorido
SDS	Dodecil sulfato de sódio
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry</i>
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>
SRB	Bactérias redutoras de sulfato
Tm	Tiomolibdato
Tris	Tris-hidroxi-metil-aminometano
TTM	Tetratiomolibdato
UV-Vis	Ultravioleta-Vísivel

1. Introdução

1.1. Molibdénio

O Molibdénio é um elemento químico com número atómico 42, encontrando-se localizado no quinto período da tabela periódica, entre o Nióbio e o Tecnécio. No estado fundamental apresenta a seguinte configuração electrónica: $[\text{Kr}]4d^55s^1$. A possibilidade de variar entre diferentes estados de oxidação (+2 a +6), bem como a capacidade de formar diferentes complexos com outros metais, confere-lhe uma versatilidade única.

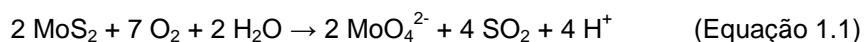
O molibdénio é o único metal $4d$ da segunda série dos elementos de transição que é necessário para o metabolismo dos sistemas biológicos, sendo essencial como elemento vestigial para todas as formas de vida [1]. Em condições fisiológicas, este metal pode variar entre três estados de oxidação, +4, +5 e +6, e participar no centro activo de muitas enzimas que catalisam reacções em etapas chave no metabolismo do carbono, azoto, selénio, arsénio, cloreto e enxofre [2]. A acessibilidade ao estado intermédio de valência (Mo^{+5}) permite-lhe actuar como transductor de um ou de dois electrões em sistemas redox [2].

Na crosta terrestre o molibdénio é um elemento raro e o seu aparecimento depende do pH, da natureza de outros minerais e da matéria orgânica presente [1]. Contudo, é o metal de transição mais abundante nos oceanos, encontrando-se disponível como ião molibdato (MoO_4^{2-}).

O ião molibdato, além de se assemelhar ao ião sulfato (SO_4^{2-}) no que diz respeito à forma, tamanho entre os ligandos e carga, consegue formar sais de sódio de elevada solubilidade [1]. A semelhança estrutural entre ambos os iões dificulta o reconhecimento e assimilação destes por parte dos sistemas biológicos [1]. O enxofre, contrariamente ao molibdénio, é um dos elementos mais abundantes na Terra, principalmente na forma de pirite (FeS_2) e sulfato de cálcio (CaSO_4). Nos oceanos encontra-se como sulfato [3]. Este elemento pode variar entre diferentes estados de oxidação desde -2 (completamente reduzido) a +6 (completamente oxidado).

O molibdénio encontra-se na forma de ião molibdato em ambientes aeróbios, enquanto em ambientes anaeróbios e na presença de elevados níveis de enxofre, o molibdénio pode ser reduzido aos estados de oxidação +5 ou +4. Nestes estados origina compostos coordenados com enxofres, como o bissulfureto de molibdénio (MoS_2) insolúvel em água [4][5]. Assim, espécies com Mo no estado +4 são favorecidas em ambientes redutores e originam compostos menos solúveis relativamente aos compostos formados em condições oxidantes, nas quais prevalece o estado de oxidação +6.

Durante os primórdios da vida na Terra, o molibdénio encontrava-se na forma de MoS_2 e, portanto, não disponível para ser incorporado. Contudo, o arrefecimento da crosta terrestre e a transformação de uma atmosfera anaeróbia para outra aeróbia através do processo de respiração dos organismos fotossintéticos [6], principiou a acumulação gradual de O_2 na atmosfera e nos oceanos e, conseqüentemente, a conversão de MoS_2 em MoO_4^{2-} (Eq. 1.1). Desta forma, o Mo passou a estar biodisponível para ser incorporado nos centros activos de muitas enzimas durante a evolução das espécies [2].



Actualmente sabe-se que este elemento além de ser essencial para a maioria dos organismos, desempenha um papel absolutamente fundamental nos ciclos biogeoquímicos do azoto, enxofre e carbono [2]. A relevância para os ciclos do azoto e do enxofre deve-se à catálise por enzimas contendo átomos de molibdénio nos seus centros activos, fundamentais para a fixação do azoto, nitrificação, assimilação do nitrato e desnitrificação no ciclo do azoto e para o metabolismo do enxofre em organismos, desde bactérias a humanos [2]. Este elemento participa também no centro activo de enzimas especializadas em determinados processos inerentes ao metabolismo aeróbico e anaeróbico do carbono, tais como a oxidação do CO a CO_2 [2].

1.2. Tetratiomolibdato

Nos seus estados de oxidação mais elevados, os metais de transição têm a capacidade de formar tiometalatos com propriedades únicas. O permanente interesse nos tiomolibdatos advém da sua capacidade de formarem complexos versáteis e multimetálicos com capacidade para mimetizar centros metálicos de proteínas com relevância em processos biológicos, tais como a nitrogenase [7] ou o problema do antagonismo Cu-Mo [8][9].

Os tiomolibdatos, comuns em ambientes anaeróbicos aquáticos, podem ser preparados através da passagem de sulfureto de hidrogénio (H_2S) por uma solução alcalina de molibdato [10]. A elevada densidade electrónica presente nos átomos de enxofre confere-lhes a capacidade de actuarem como ligandos, possibilitando a coordenação a centros metálicos em diferentes estados de oxidação. O molibdato deixa de ser a forma predominante e formam-se tioaniões através da substituição sucessiva dos óxidos por iões sulfureto (S^{2-}) fortemente redutores (Figura

1.1). Esta substituição depende do pH e da concentração de íons sulfureto e é evidenciada através da alteração da cor da solução [11][12]:

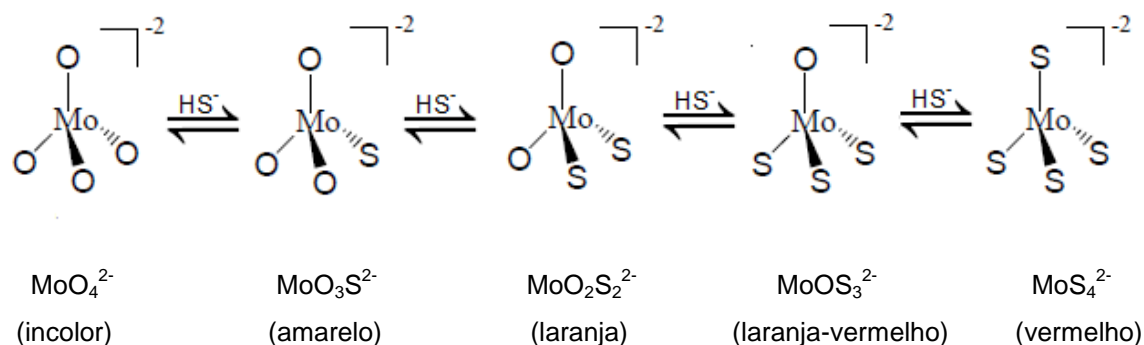


Figura 1.1. Representação da estrutura dos tiomolibdatos [9].

As cores intensas características destes íões resultam da presença de bandas de transferência de carga S→M de elevada energia na região do visível [9], tal como se pode observar na Figura 1.2.

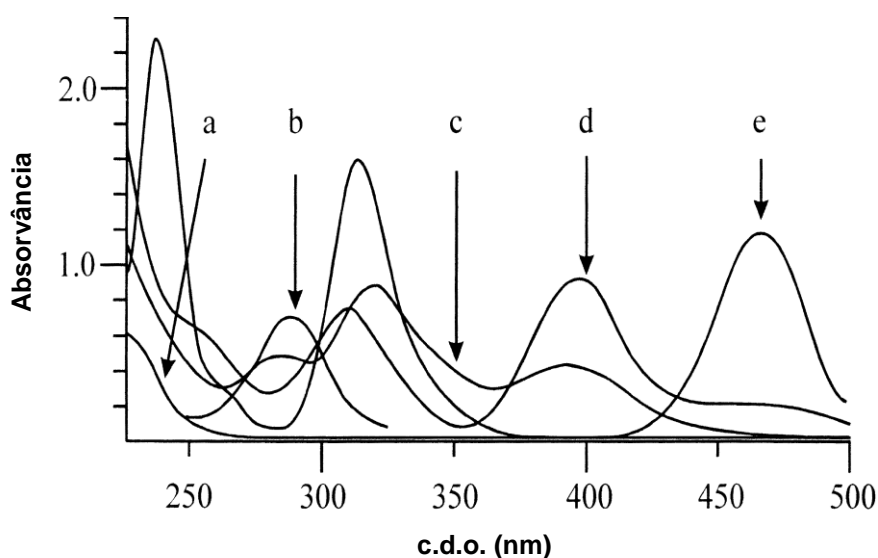


Figura 1.2. Espectros UV-Visível do molibdato e tiomolibdatos: **a.** MoO₄²⁻, **b.** MoO₃S²⁻, **c.** MoO₂S₂²⁻, **d.** MoOS₃²⁻, **e.** MoS₄²⁻. Figura adaptada da referência [16].

A decomposição dos íões tiomolibdato pode ser causada através da sua reacção de hidrólise a oxometalatos, por um processo intramolecular redox ou através da formação de sulfuretos [8]. A estabilidade dos íões tiomolibdatos diminui com o aumento da concentração em oxigénio e da densidade electrónica nos ligandos [8]. Assim, o ião tetratiomolibdato (TTM) possui elevada estabilidade térmica e hidrolítica, o que simultaneamente com a sua facilidade de preparação e relevância biológica, o tornou alvo de diversos de estudos [2][9].

Na estrutura deste ião (TTM), o molibdénio encontra-se no estado de oxidação +6 e possui a configuração electrónica d^0 . A sua geometria tetraédrica envolve a presença de ligações do tipo σ e π entre o metal e os iões sulfuretos [13]. O espectro característico do TTM apresenta duas bandas de forte absorção a 316 e 465 nm (Figura 1.2.e). A cor vermelha que exhibe resulta da transição de transferência de carga $d \leftarrow p$, do S^{2-} para Mo^{+6} na região do visível. [14][14].

Os TTMs são muito reactivos e têm a capacidade de formar uma ampla gama de complexos heterometálicos com diferentes geometrias. Esta capacidade quelante advém da presença de um par de electrões livre nos iões sulfureto, permitindo-lhes actuar como ligandos em ponte entre o molibdénio e outros metais, como o cobre e o ferro, originando centros multinucleares. A presença destes iões é fundamental para que os TTMs possam actuar como ligandos na formação de estruturas lineares ou como “alicerces” em estruturas complexas.

Os TTMs possuem elevada afinidade para coordenar o cobre, especialmente Cu^+ [13]. O MoS_4^{2-} reage directamente com o $CuCl_2$, reduzindo o Cu^{+2} a Cu^+ , conduzindo à formação de centros polinucleares em que o átomo de Mo se encontra coordenado com 1 a 6 iões cobre, apresentando a fórmula geral $[MoS_4(CuL)_n]$ ($n=1-6$) [9]. Os complexos formados dependem da razão entre os reagentes de partida, bem como da natureza do solvente [9].

1.3. Relevância biológica do molibdénio

A primeira evidência da interacção biológica entre o Mo e o Cu surgiu há algumas décadas, com o aparecimento de uma doença fatal em bovinos e ovinos. *Ferguson* e os seus colaboradores observaram, em 1938, que os ruminantes que pastavam em solos ricos em MoO_4^{2-} , desenvolviam sintomas como perda de peso, diarreia e anomalias esqueléticas, características de deficiência em cobre [15].

O rúmen, componente do sistema digestivo dos ruminantes, além de hospedar um complexo ecossistema microbiano é anaeróbio. Sob estas condições, os enxofres são reduzidos a iões sulfureto [9]. O molibdato proveniente da alimentação reage com os sulfuretos e formam-se TMs que rapidamente coordenam o cobre presente no organismo, causando deficiência secundária em cobre [16]. Este tipo de insuficiência deve-se à presença de um antagonista, e não à carência de cobre na alimentação. Elevados níveis de molibdénio por si não induzem a deficiência em cobre, isto é, não apresentam praticamente afinidade para se ligar a iões de cobre, contudo, o MoS_4^{2-} formado no trato digestivo consegue reagir com Cu^{+1} ou Cu^{+2} e originar compostos insolúveis [17]. O molibdénio interfere com o metabolismo do cobre antes e depois da reabsorção devido à formação de complexos Cu-TM-proteína tornando o cobre indisponível para fins metabólicos [8].

O antagonismo entre o TTM e o Cu inspirou o desenvolvimento de compostos de molibdénio como potenciais antídotos para o tratamento de doenças dependentes de cobre em

humanos, como a doença de Wilson (DW). Esta doença, resulta de uma mutação no gene ATP7b, que codifica para uma ATPase transmembranar do tipo-P, transportadora de cobre, envolvida na excreção deste metal [18][20]. Esta proteína desempenha um papel fundamental na homeostase deste elemento. Como consequência da mutação no gene, o cobre acumula-se em diversos órgãos, incluindo o cérebro e o fígado.

Estudos em modelos animais concluíram que o TTM administrado via interperitonal é muito efectivo no tratamento de ratos LEC (*Long-Evans Cinamon*) com uma mutação homóloga para a DW [19]. O mecanismo molecular resultante deste tratamento deve-se à coordenação de um a seis átomos de cobre ao TTM por dois dos seus ligandos enxofre e por ligandos externos ao centro, sendo a estequiometria 3Cu:1Mo a mais comum, formando um centro trigonal do tipo $[(RSCu)_3S_4Mo]^{2-}$, representado na Figura 1.3 [19][20]. Este mecanismo de acção indica que a formação dos complexos resulta no decréscimo da biodisponibilidade do cobre ou na alteração das suas propriedades redox [19].

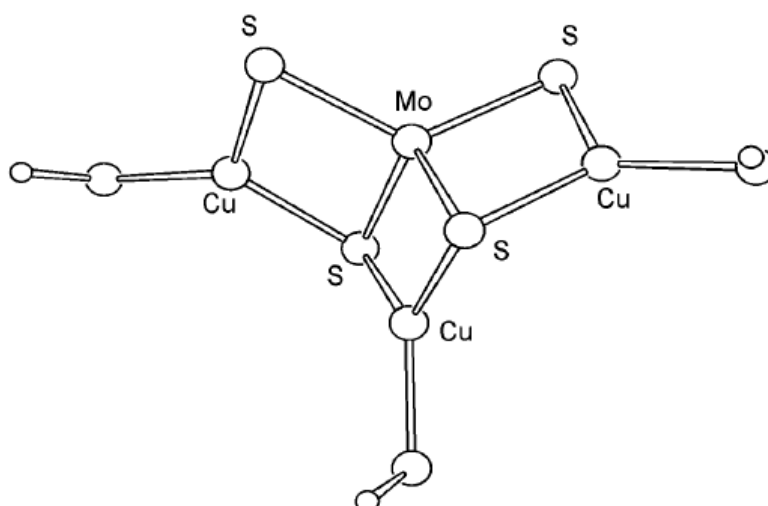


Figura 1.3. Representação da estrutura $[(HSCu)_3S_4Mo]^{2-}$. Figura reproduzida da referência [19].

O TTM tem sido utilizado como agente terapêutico na DW, devido à sua acção rápida e eficiência superior relativamente a outros agentes quelantes comumente utilizados, tais como a D-penicilamina e a trietilenotetramina, os quais possuem efeitos secundários indesejados e deterioração neurológica a longo prazo [20]. Outras propriedades singulares tornam este agente terapêutico extremamente interessante, tais como a sua especificidade para o cobre e reduzida toxicidade[21], assim como um mecanismo de acção único [22].

Por forma a compreender melhor o mecanismo de acção do TTM, *Alvarez et al.*, investigaram a interacção do TTM com a chaperona de cobre ATX1, em leveduras. Através de estruturas cristalográficas de raios-X desta proteína concluíram que o TTM não remove o cobre

da chaperona, mas forma um complexo oligomérico com esta inibindo a transferência do cobre para a ATPase Ccc2 [17]. A chaperona utilizada nestes estudos está relacionada com a metalochaperona ATOX1, em humanos, que transfere o cobre para o domínio N-terminal da ATPase7b (envolvida na DW) [17].

O TTM é um antagonista celular potente no *trafficking* e transporte de cobre, com potencial aplicação em terapia de quelação. Estudos desenvolvidos em ratos, sugerem que para além de promissor no tratamento da doença de Wilson, o TTM, parece também ter potencial aplicação na supressão do crescimento tumoral, em tumores metastáticos da mama [23][22] e na inibição da angiogénese, uma vez que o cobre estimula a proliferação e migração das células endoteliais humanas [24].

1.4. Proteínas contendo molibdénio

De acordo com as características funcionais da proteína e o tipo de metal-ligando presente no seu centro, as proteínas contendo molibdénio são classificadas em dois grupos (Figura 1.4): o grupo das enzimas e o grupo das proteínas sem actividade enzimática conhecida.

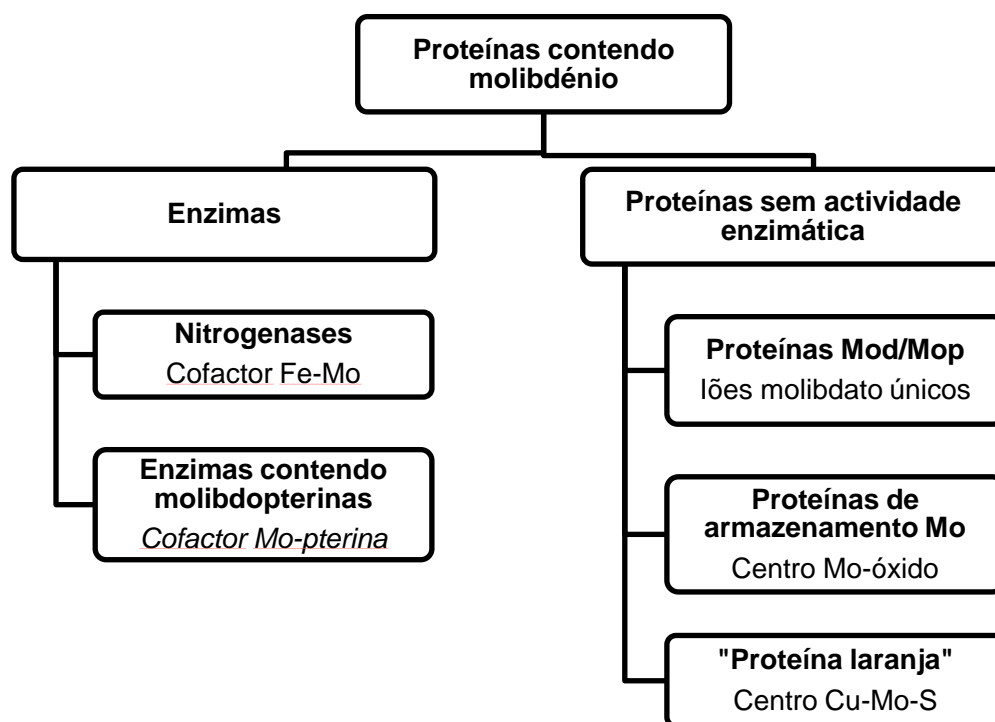


Figura 1.4. Classificação das proteínas contendo Mo de acordo com as suas características funcionais e tipo de centro. Figura adaptada da referência [34].

Com base na composição do cofactor e na função catalítica, as enzimas dependentes de molibdénio podem agrupar-se em dois sub-grupos: as nitrogenases bacterianas contendo um cofactor de ferro-molibdénio (FeMo-co) no centro activo [25] e as enzimas contendo

molibdopterinas, em que o átomo central se encontra coordenado a uma ou duas moléculas de piranopterinas e a um número variável de ligandos, como átomos de oxigénio (oxo, hidroxio, água, serina, ácido aspártico), enxofre (cisteínas) e selénio (seleno-cisteínas) [26].

As nitrogenases, envolvidas no ciclo do azoto, providenciam a redução do azoto molecular (N_2) a amónia (NH_3). Até recentemente, foram identificados três sistemas homólogos da nitrogenase: Molibdénio-Ferro-Enxofre, Vanádio-Ferro-Enxofre e Ferro-Enxofre [27]. Todos estes centros contêm ferro e estão envolvidos em reacções redox.

A nitrogenase contendo molibdénio é um sistema enzimático complexo com dois tipos de proteínas: a Fe-proteína e a MoFe-proteína. A Fe-proteína, é um homodímero α_2 com um centro $[4Fe-4S]$, coordenado por dois resíduos de cisteína das duas subunidades [28]. A sua função é transferir electrões para a Mo-Fe proteína, processo acompanhado pela reacção de hidrólise de duas moléculas de ATP. A Mo-Fe-proteína é um heterotetramero $\alpha_2\beta_2$ que contém dois tipos de centros: o *P-cluster*, um centro $[8Fe-7S]$ que se pensa ser de transferência electrónica e o FeMo-co, um centro $[Mo-7Fe-9S-X-homocitrate]$ (em que X pode ser um átomo de carbono, oxigénio ou azoto), onde eventualmente ocorre a redução do substrato [27].

As enzimas contendo molibdopterinas podem dividir-se em três sub-grupos de acordo com a coordenação química do molibdénio nos seus centros activos [29][30]: xantina oxidase (XO), dimetilsulfóxido reductase (DMSOR) e sulfito oxidase (SO) [31][32], que incluem não apenas as enzimas que dão o nome ao grupo mas diversas enzimas. Estas proteínas podem possuir cofactores redox como os centros ferro-enxofre (Fe-S), hemo e grupos flavínicos que estão envolvidos em processos de transferência electrónica intra e intermoleculares [26]. As famílias da XO e da SO diferem apenas na natureza do terceiro ligando Mo-S [25]. A família da DMSO é diversificada em termos de estrutura e função, no entanto, em todas as proteínas o molibdénio é coordenado com dois cofactores de pterina [2].

As proteínas sem actividade enzimática dividem-se em três sub-grupos: proteínas de ligação ao molibdato (Mod/Mop), proteínas de armazenamento de molibdénio e um novo grupo que integra a proteína laranja (ORP). As proteínas Mod/Mop possuem a capacidade de armazenar até 8 átomos de Mo por proteína [33] e desempenham funções de transporte de molibdénio, homeostase e regulação genética [34]. As proteínas de armazenamento de Mo contêm um agregado Mo-óxido e têm a capacidade de incorporar pelo menos 90 átomos de Mo por molécula de proteína [34]. Um novo centro, contendo Mo e cobre, dois metais antagonistas, foi observado na proteína laranja (ORP) [35].

1.5. Proteína laranja (ORP)

Apesar de conhecida a reactividade entre o tetratiomolibdato e o cobre, a identificação de uma proteína, na sua forma nativa, contendo Mo e Cu no seu centro metálico, foi surpreendente.

A proteína laranja, assim denominada devido à sua cor, foi isolada a partir de bactérias redutoras de sulfato, *Desulfovibrio gigas* (*D. gigas*), crescidas num meio rico em lactato-sulfato, em condições anaeróbias [35].

Estudos de caracterização realizados por *Bursakov S.A. et al.*, revelaram tratar-se de uma proteína monomérica solúvel de 11,8 kDa constituída por 117 resíduos de aminoácidos [36]. A presença do MoS_4^{2-} na estrutura do cofactor, exibindo a cor laranja, contribui para a presença de duas bandas intensas de absorção a 480 e a 338 nm no espectro de UV-Vísivel (UV-Vis) da proteína [36].

A análise EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*) para o molibdénio indica a presença de 4 ligações Mo-S a uma distância de 2,21 Å, com a interacção Mo...Cu a 2,75 Å, enquanto a análise para o cobre determina a presença de 4 ligações Cu-S a 2,31 Å, com duas interacções Cu...Mo a 2,74 Å [35]. Os espectros obtidos por EXAFS indicam que o Mo se encontra no estado de oxidação +6, tio-coordenado com o Cu no estado de oxidação +1, numa geometria aproximadamente tetraédrica [35]. Os dados evidenciam a presença de um único cobre em interacção com dois átomos de molibdénio através de ligandos de enxofre, revelando que a ORP possui um centro heterometálico único do tipo $[\text{S}_2\text{MoS}_2\text{CuS}_2\text{MoS}_2]^{3-}$, que se encontra ligado não covalentemente à cadeia polipeptídica [35][36][37]. A estrutura do centro metálico é apresentada na Figura 1.5.

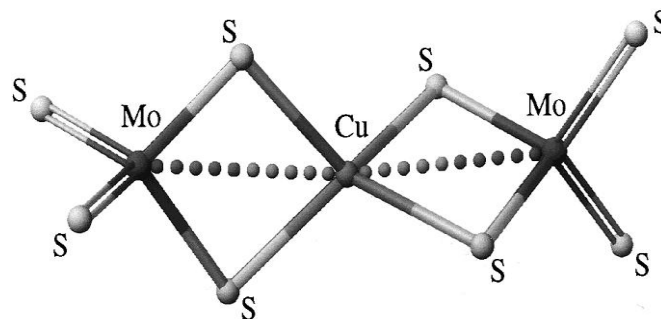


Figura 1.5. Estrutura do centro metálico da ORP $[\text{S}_2\text{MoS}_2\text{CuS}_2\text{MoS}_2]^{3-}$ proposta por análise EXAFS. Figura reproduzida da referência [35].

A presença de Cu^{+1} no centro metálico, confirmada por EXAFS, está de acordo com os estudos reportados por *Laurie S. H. et al.*, que sugerem a redução do ião Cu^{+2} a Cu^{+1} , em espécies contendo CuCl_2 e MoS_4^{2-} , em que os metais se encontram ligados através de uma geometria tetraédrica [36][38].

Estudos de caracterização da proteína nativa, utilizando a espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (EPR) não detectaram a presença de qualquer espécie com sinal de EPR [36]. Possivelmente este centro não estará envolvido em processos de transferência

electrónica, uma vez que o estado de oxidação dos metais parece não sofrer qualquer alteração quer por oxidação, quer por redução.

A informação estrutural preliminar foi obtida através de ressonância magnética nuclear (RMN), que permitiu a atribuição completa da ressonância da forma apo-ORP, expressa heterologicamente em *Escherichia coli* (*E.coli*) [37]. Recentemente, Maiti, B. et al., desenvolveram dois compostos sintéticos análogos ao centro da ORP, um contendo pequenos grupos orgânicos ($\text{MoS}_4\text{-Cu-tiol}$) e o outro contendo um átomo de cádmio ($\text{MoS}_4\text{-Cd}$), com o objectivo de identificar o sítio de ligação do centro na proteína, através de RMN [39]. Os compostos sintetizados, apresentavam sinal de RMN, podendo ser posteriormente utilizados na reconstituição da apo-ORP, com a finalidade de obter a informação estrutural pretendida [39]. Outros estudos foram efectuados na tentativa de obter a estrutura de raios-X da holo-ORP, no entanto apenas os cristais da forma apo difractaram, com uma resolução de 2,0 Å [40]. A estrutura cristalográfica obtida encontra-se apresentada na Figura 1.6.

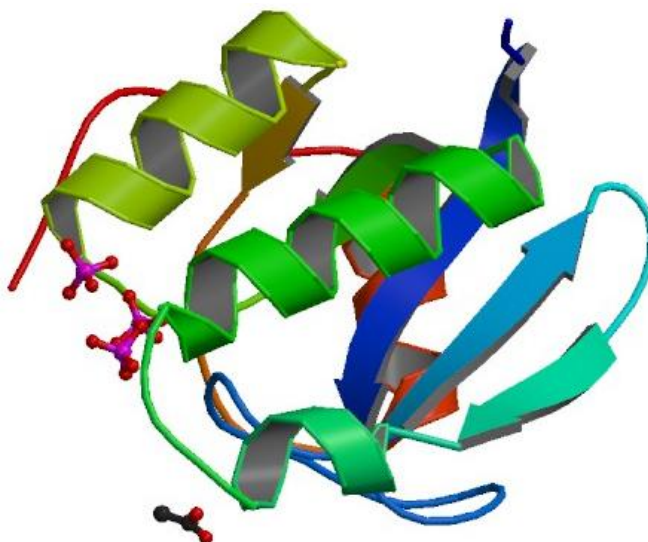


Figura 1.6. Estrutura da forma apo da ORP de *D. gigas*. Figura reproduzida de *Protein Data Bank* (PDB) – 2WFB.

A apo-ORP possui três hélices α e cinco folhas β . As cinco folhas β estão na ordem $\beta 3$, $\beta 2$, $\beta 1$, $\beta 4$ e $\beta 5$, com $\beta 2$ antiparalela relativamente às outras quatro folhas β . As hélices $\alpha 1$ e $\alpha 2$ encontram-se de um lado da folha β , enquanto que a hélice $\alpha 3$ se encontra do lado oposto.

A função da ORP permanece desconhecida. O alinhamento de sequências mostra semelhança com proteínas hipoteticamente conservadas de *archaea*- e *eubacteria* hipertermofílicas, 35% com a *Thermotoga marítima* (TM1296) e 32% com a *Methanobacterium thermoautotrophicum* (MTH1175), no entanto, a função bioquímica destas permanece por determinar [36]. A química do seu cofactor, com Mo e Cu, conjugada com as indicações de que o

seu centro não é facilmente reduzido ou oxidado, bem como a sua instabilidade, indiciam a possibilidade da ORP possuir um papel na eliminação ou no armazenamento de cobre [36][41].

A semelhança de sequências com genomas sequenciados ou parcialmente sequenciados permitiu a identificação deste gene em outras espécies do género *Desulfovibrio* que são sintróficas como *archaea* metanogénicas [37].

1.6. Operação da ORP de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

As bactérias redutoras de sulfato (SRB) são microorganismos anaeróbios que utilizam o sulfato como aceitador terminal de electrões na degradação de compostos orgânicos [3]. Este processo resulta na produção de sulfuretos, que são posteriormente incorporados em aminoácidos e enzimas contendo enxofre [3]. Estas bactérias, ubíquas em ambientes anóxicos, apresentam grande versatilidade metabólica, pois além de conseguirem utilizar uma vasta gama de outros substratos [42], desempenham um papel importante no ciclo global de diversos elementos, tais como o enxofre e o carbono. Estes microorganismos são também importantes na biorremediação de metais pesados e remoção de compostos de enxofre de águas residuais e gases de combustão [3]. Por outro lado, estão ainda envolvidos na biocorrosão de metais ferrosos em ambientes anaeróbios [43], causando inúmeros problemas a diversas indústrias devido à excessiva produção de sulfuretos, os quais são extremamente tóxicos e corrosivos[3].

As SRB podem ser agrupadas em sete linhagens filogenéticas, duas em espécies *archaea* (*Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*) e cinco em bactérias (*Deltaproteobacteria*, *Nitrospirae*, *Clostridia*, *Thermodesulfobiaceae* e *Thermodesulfobacteria*) [3]. A sua fisiologia e bioquímica foi principalmente estudada no género *Desulfovibrio*, membro da δ -proteobactéria, particularmente em alguns organismos modelo como *Desulfovibrio alaskensis* G20, *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough e *Desulfovibrio gigas* [3]. Actualmente mais de 20 genomas completos de SRB estão disponíveis, incluindo os géneros *Desulfovibrio alaskensis* G20 e *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. A disponibilidade das sequências dos genomas contribui para o entendimento do modo de vida das SRB.

A análise do genoma de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough revelou que 34% do genoma é constituído por genes hipotéticos (HYP) (9,5%) e hipotéticos conservados (CHYP) (24,4%) os quais codificam para proteínas de função desconhecida [44][45]. Algumas destas proteínas presentes em *D. vulgaris* Hildenborough são conservadas em organismos anaeróbios, pelo que podem ser importantes para a fisiologia celular especializada e metabolismo ou podem possuir funções únicas, possivelmente funções celulares no modo de vida anaeróbico deste organismo e de outras SRB [46].

A base de dados COG (*cluster of groups of orthologous proteins*) é uma ferramenta utilizada para análise genómica comparativa com aplicações importantes na anotação funcional de novos genomas sequenciados [47][48]. Cada COG inclui proteínas que se pensa serem ortólogas, isto é, estão interligadas através de descendentes evolucionários em que a informação funcional é transferida de um membro para todo o COG [48][49].

Na análise comparativa com genomas de microorganismos anaeróbios e aeróbios foram identificados 33 COGs específicos para o modo de vida dos anaeróbios, cinco dos quais correspondentes a proteínas conservadas de função desconhecida [44][48]. Este grupo inclui o COG1433 que compreende os genes *DVU2107*, *DVU2108* e *DVU2109* em *D. vulgaris* Hildenborough [46].

O gene *DVU2108* codifica para uma proteína com um domínio do tipo MTH1175, que partilha 48% de semelhança com a ORP de *D. gigas*. Genes homólogos de *DVU2108* estão presentes em vários genomas de *archaea* e bactérias e encontram-se normalmente agrupados com homólogos de *DVU2103* e *DVU2104* [46][50].

Em *D. vulgaris*, os genes *DVU2103* e *DVU2104* pertencem ao COG1149, que compreende a superfamília *Min-D P-loop ATPases* contendo um domínio ferredoxina, mais concretamente centros do tipo [4Fe-4S] [50]. Este domínio putativo de Fe-S tem elevada homologia com várias sintetases de *a,c*-diamidas do ácido cobirínico (CbiA) que estão envolvidas no mecanismo da biossíntese da vitamina B12 [51]. Proteínas contendo centros Fe-S podem actuar como centros catalíticos em muitas enzimas assim como sensores para ferro e oxigénio ou proteínas de transferência electrónica [52].

Estudos realizados com a SRB *D. vulgaris* Hildenborough e com a metanogénica *archaea Methanosarcina barkeri* mostraram que a expressão deste conjunto de três genes aumenta quando as condições de crescimento de *D. vulgaris* são alteradas de sintrofismo para redutoras de sulfato [50]. Esta alteração do modo de vida da bactéria aumenta 3 a 4 vezes os níveis de expressão do gene *DVU2108* e 2 a 3 vezes os níveis de expressão dos genes *DVU2103* e *DVU2104* [50]. A presença destes genes, como um operão em três espécies de *archaea* e oito de bactéria sugere que estes foram transferidos horizontalmente a partir de uma metanogénica *archaea* ancestral [50], podendo estar envolvidos em funções celulares comuns.

Em *D. vulgaris* Hildenborough o gene *DVU2108* não está localizado no mesmo operão que os genes *DVU2103* e *DVU2104*. Este operão está organizado em três unidades transcricionais distintas: duas unidades transcricionais com direcções opostas, a ORP1 (que compreende os genes *DVU2103-DVU2104-DVU2105*) e a ORP2 (que inclui os genes *DVU2107-DVU2108-DVU2109*), separadas por uma unidade transcricional monocistrónica, o regulador (*DVU2106*) [46]. O gene *DVU2106* regula ambos os operões ORP1 e ORP2, não tendo sido identificados outros sítios de ligação do regulador no genoma de *D. vulgaris*. Na Figura 1.7 é

apresentada a disposição dos genes no operão da ORP de *D. vulgaris* Hildenborough, bem como as proteínas codificadas por cada um desses genes.

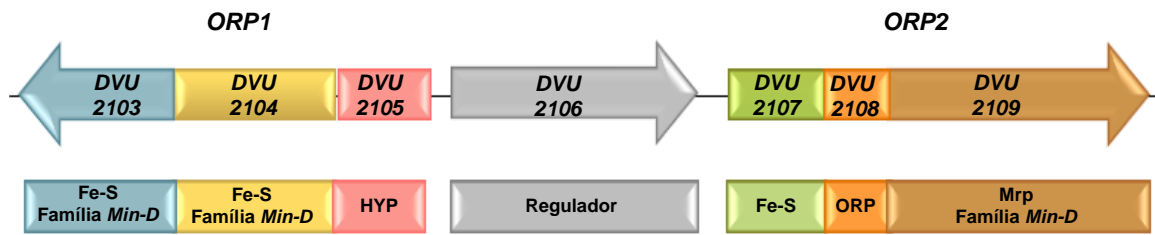


Figura 1.7. Representação esquemática da disposição dos genes no operão da ORP em *D. vulgaris* Hildenborough e proteínas codificadas por esse operão.

Estudos de *pulldown* endógeno realizados evidenciaram a formação de um multicomplexo fisiológico entre as proteínas DVU2103, DVU2104, DVU2105, DVU2108 e DVU2109, denominado por complexo ORP [46].

A montante de *ORP1* e *ORP2*, a -24/-12 pb, foram identificadas duas regiões promotoras dependentes de σ^{54} , similares a outras regiões conservativas previamente identificadas [53][54]. Para que ocorra a transcrição das unidades *ORP1* e *ORP2* é necessária a ligação da RNA polimerase, associada ao factor σ^{54} , às regiões promotoras, bem como a associação de outros factores de transcrição denominados EBPs (*Enhancer Binding activators Proteins*) [46][53]. O gene monocistrónico, *DVU2106*, codifica para um EBP homólogo que se liga às regiões promotoras dos operões *ORP1* e *ORP2* permitindo o controlo positivo da expressão destes genes assim como o controlo negativo da sua própria expressão, através do factor σ^{70} da RNA polimerase [46]. Os mecanismos regulatórios do operão da ORP são apresentados na Figura 1.8.

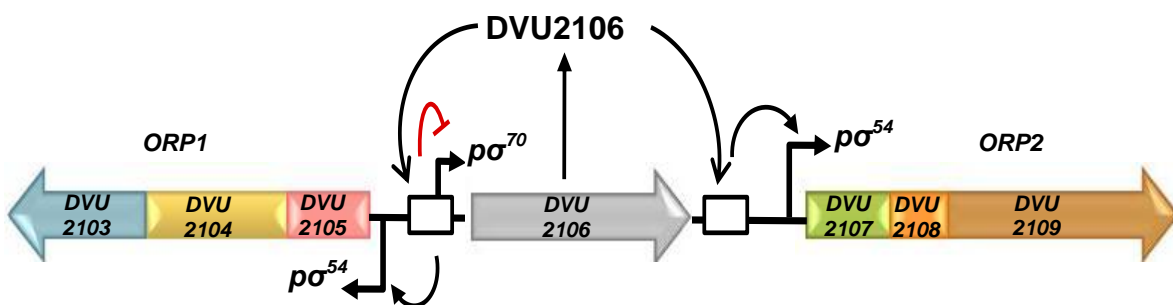


Figura 1.8. Representação esquemática dos mecanismos regulatórios do operão ORP em *D. vulgaris* Hildenborough. Figura adaptada da referência [46].

O gene *DVU2106* possui um domínio Per-ARNT-Sim (PAS) ligado ao N-terminal. Os domínios PAS são sensores que detectam uma variedade de estímulos químicos e físicos, que incluem oxigénio, luz, potencial redox e voltagem [55][56]. O interesse na identificação do sinal detectado por *DVU2106*, bem como a importância entre o domínio PAS e o modo de vida do género *Desulfovibrio*, levaram *Fiévet et al.*, a construir uma estirpe mutada *DvH(p2106::2106PAS)* [46]. Os resultados deste estudo revelaram que a mutação no regulador *DVU2106* impede a activação da expressão de ambos os operões *ORP1* e *ORP2*, tendo como consequência a observação de defeitos morfológicos nas células [46]. Assim, as células mutantes apresentaram uma morfologia heterogénea com o aparecimento de células espirais irregulares (células alongadas e células pequenas), enquanto no fragmento não mutado (*Wild-type*) as células apresentaram a forma de hastes ligeiramente curvadas [46]. Esta alteração morfológica nas células pode resultar da ausência da transcrição dos genes dependentes da *DVU2106*, isto é, da ausência do complexo ORP. Os autores deste estudo sugerem que a divisão celular ou o controlo do crescimento celular foi afectado [46]. Observações morfológicas semelhantes foram descritas anteriormente em estirpes *Min* mutantes de *E.coli* [57][58].

1.7. Sistema *Min* de *E.coli*

O processo de divisão celular, que ocorre na maioria das bactérias, deve-se à formação de um septo de divisão. O posicionamento do septo na célula é um dos problemas fundamentais em biologia, uma vez que tem de estar coordenado com o crescimento celular e a segregação dos cromossomas, garantindo que cada célula filha recebe uma cópia [57].

A citocinese é iniciada pela polimerização da proteína FtsZ, homóloga da tubulina, originando um elemento do citoesqueleto, o *Z-ring* (septo de divisão), que recruta outras proteínas essenciais ao processo [59][60]. A elevada precisão deste processo envolve a oclusão do nucleóide, em que a formação do *Z-ring* é inibida nas proximidades do cromossoma da bactéria [61] e a inibição da divisão celular na proximidade dos pólos das células, através do sistema *Min* [62]. Em *E.coli*, a proteína SlmA, regulador negativo do *Z-ring*, é sobreproduzida e previne a formação do *Z-ring* e a septação sobre os nucleóides segregados das células filhas [63].

Estudos realizados por *Alder et al.*, referentes ao isolamento de *Min* mutantes em *E.coli* permitiram a identificação de pequenas minicélulas anucleadas a partir dos pólos das células mãe [64], concluindo que a presença do sistema *Min* é essencial para a normal divisão celular. O operão *minB* contém três genes designados por *MinC*, *MinD* e *MinE*, que codificam para três proteínas que actuam em conjunto de forma a inibir a formação do septo perto das extremidades da célula [58]. Neste sistema, a *MinC* inibe a divisão celular, a *MinE* é um factor de especificidade que limita a actividade de *MinC* para locais distantes do centro da célula e a *MinD* é uma proteína de ligação à membrana que interage com a *MinC* e com a *MinE* [58]. *Raskin e de*

Boer, através de proteínas de fusão *Green Fluorescent Protein* (GFP), revelaram que este sistema apresenta um comportamento dinâmico, isto é, os produtos dos genes *MinC* e *MinD* oscilam rapidamente entre os pólos formando uma onda [65]. Durante o ciclo de oscilação, a *MinD* liga-se à membrana, como dímero, através de uma pequena hélice nascente C-terminal MTS (*membrane-targeting sequence*), que consegue interagir com os fosfolípidos mediante a ligação ao ATP [66]. Após a ligação, a *MinD* recruta a *MinC* e ambas cooperam e formam uma zona polar inibidora da divisão que vai desde o pólo até ao centro da célula e cuja acção é limitada pela *MinE*, que se liga como dímero, e forma um *E-ring* [67][57]. Posteriormente a *MinE* liberta a *MinC* e estimula a actividade ATPase da *MinD*. Após a hidrólise do ATP, a *MinD* dissocia-se da membrana, uma vez que possui uma afinidade reduzida para a bicamada. A *MinD*-ADP difunde-se através do citoplasma, regenera-se a *MinD*-ATP e uma nova zona polar é estabelecida na outra extremidade da célula e o ciclo é repetido [67]. A Figura 1.9. mostra as interações moleculares do sistema *Min* de *E.coli*, na divisão celular.

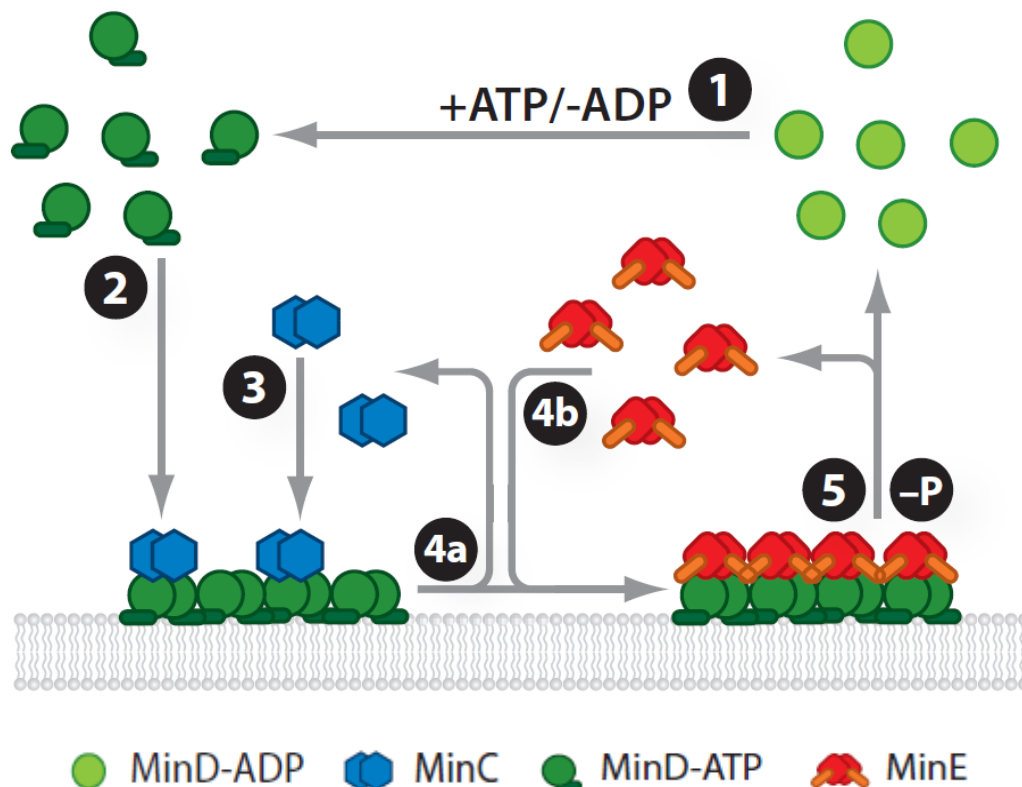


Figura 1.9. Interações moleculares entre as proteínas *Min* e a membrana. 1. Recrutamento de uma molécula de ATP pela *MinD*. 2. Associação da *MinD*-ATP à superfície interna da membrana citoplasmática. 3. Associação da *MinC* com a *MinD*-ATP. 4a. Dissociação da *MinC*. 4b. Conexão da *MinE* à *MinD*. 5. A *MinE* activa a ATPase da *MinD*, resultando na conversão do ATP a ADP e consequente libertação do fosfato. De seguida, a *MinD* dissocia-se da membrana. Figura adaptada da referência [67].

A oscilação do sistema *Min* de *E.coli* é um exemplo de auto organização da bactéria. A concentração de *MinC* é mantida em níveis elevados perto das extremidades da célula, e

portanto a divisão é inibida, enquanto no centro da célula a concentração deste inibidor é reduzida, permitindo a polimerização da proteína FtsZ e a formação do *Z-ring* [67]. O gradiente de inibição da MinC e a oclusão do nucleóide restringem a polimerização da FtsZ ao centro da célula, tal como se pode observar na Figura 1.10.

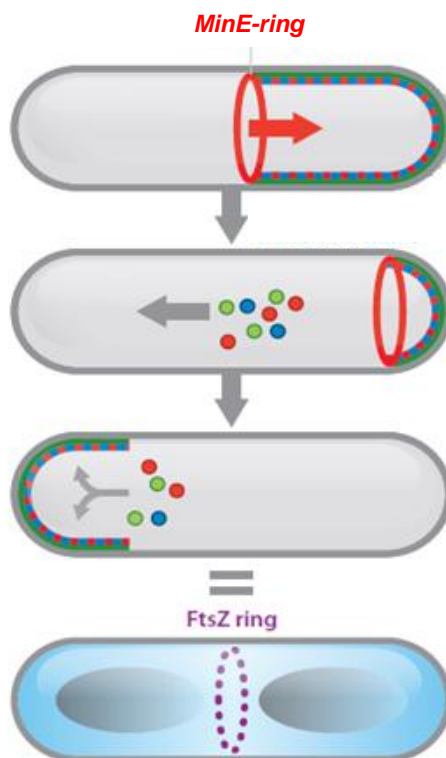


Figura 1.10. Dinâmica do sistema *Min* em *E. coli*: a *MinD* (verde) associa-se à membrana e recruta a *MinC* (azul) formando uma zona polar, restrita a actuar nas extremidades da célula pela *MinE* (vermelho). Quando esta zona polar desaparece, outra é estabelecida na extremidade oposta. A inibição do gradiente de *MinC* e a oclusão do nucleóide posicionam o *Z-ring* no centro da célula. Figura adaptada da referência [67].

Até ao momento não foram identificados quaisquer homólogos de *MinC* e *MinE* no genoma de *D. vulgaris* Hildenborough. No entanto, tal como referido anteriormente, os genes *DVU2103* e *DVU2104* são homólogos com a família *MinD P-loop ATPase* e pertencem ao COG1149 que apenas se encontra presente em microorganismos anaeróbios [46]. Nenhuma informação funcional é conhecida relativa à função das proteínas codificadas por estes genes. Sabe-se, também, que na ausência do complexo ORP, as células encontram-se morfológicamente alteradas [46]. Face a estas evidências, *Fiévet et al.*, sugerem que este conjunto de genes se encontra envolvido na divisão celular, em particular, na localização apropriada do *Z-ring* no meio da célula, em *Desulfovibrio* e em outros organismos anaeróbios [46].

1.8. Centros [Fe-S]

Os centros de [Fe-S] são ubíquos e são descendentes evolucionários de grupos prostéticos presentes em todos os organismos [68]. A principal função destes centros é a transferência electrónica em processos biológicos, uma vez que possuem a capacidade de deslocar electrões em ambos os átomos de ferro e de enxofre [69].

Além da sua função primária, estes cofactores são essenciais em outros processos biológicos incluindo a biossíntese e transferência de centros Fe-S, a ligação do substrato e catálise, a regulação da expressão dos genes e a reparação de DNA [70][71].

As extraordinárias propriedades químicas do ferro e do enxofre tornam este cofactor muito versátil em termos de coordenação e propriedades redox, possibilitando a formação de diferentes tipos de estruturas. As estruturas características deste tipo de centros podem distinguir-se pelo número de átomos de ferro e de enxofres inorgânicos, cujos centros mais simples são: [1Fe], [2Fe-2S], [3Fe-4S] e [4Fe-4S], que se encontram representados na Figura 1.11.

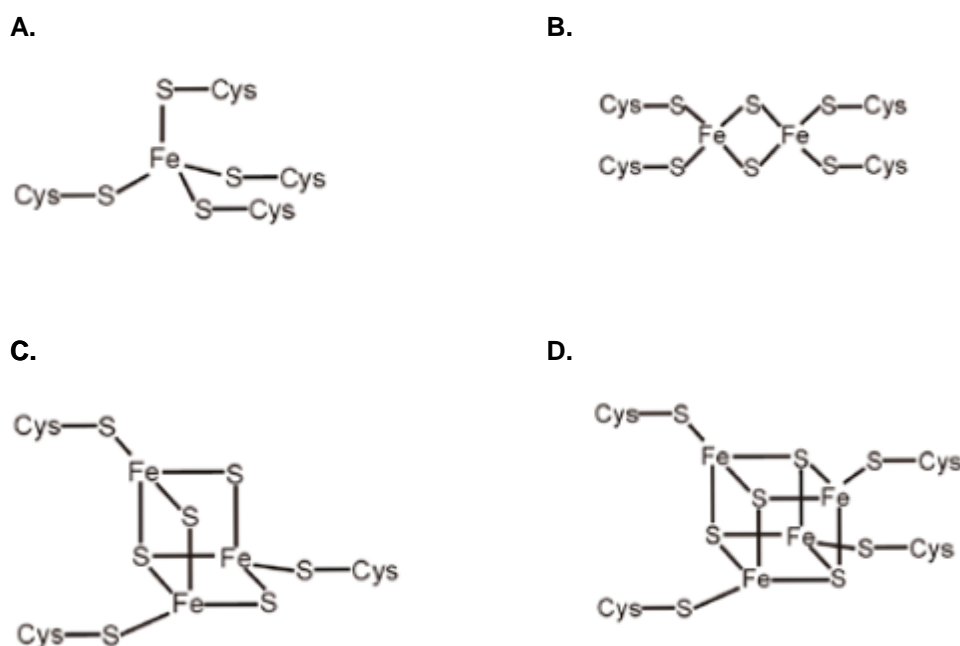


Figura 1.11. Estrutura dos centros Fe-S: A. centro [1Fe]; B. centro [2Fe-2S]; C. centro [3Fe-4S] e D. centro [4Fe-4S]. Figura adaptada da referência [72].

Os centros ferro-enxofre participam nos centros redox activos das ferredoxinas (Fds), uma das maiores classes de transportadores de electrões em biologia. Estas proteínas, de reduzida massa molecular, estão envolvidas em processos fundamentais à vida tais como fotossíntese, fixação do azoto e fosforilação oxidativa [73]. A distinção clássica entre Fds baseia-

se nos seus potenciais de redução. Enquanto a maioria das ferredoxinas possui a capacidade de transferir electrões com potencial reduzido (- 250 a - 650 mV), as Fds denominadas por *High Potencial Iron Proteins* (HiPIP) possuem um potencial redox positivo (+ 50 a + 450 mV) e contêm um centro cúbico do tipo [4Fe-4S] [74].

A primeira evidência da presença de centros do tipo [4Fe-4S], surgiu em 1968 através de um estudo cristalográfico, com resolução de 4 Å, que indicou a presença de um potencial centro 4Fe na HiPIP *Chromatium vinosum* [75]. Posteriormente este tipo de centro foi identificado em outras proteínas, tais como a aconitase [76].

Os centros [4Fe-4S] são normalmente ligados à cadeia polipeptídica por quatro resíduos de cisteínas, tal como apresentado na Tabela 1.1. Contudo a ligação, não usual, a outros resíduos, tais como histidina, glutamina e aspartato, também foi observada para este tipo de centros, nomeadamente em hidrogenases [NiFe] [77] e [FeFe] [78].

Tabela 1.1. Motivos de ligação aos centros [4Fe-4S] encontrados em diversas proteínas.

Proteína	Modo de ligação dos centros [4Fe-4S]	Ref.
4Fe Fd	Cys8 Cys11 Cys14 Cys50	[79]
4Fe Fd (<i>Pyrococcus furiosus</i>)	Cys12 Asp15(Oδ) Cys18 Cys57	[80]
8Fe Fd (2 × [4Fe-4S])	Cys8 Cys11 Cys14 Cys47 Cys18 Cys37 Cys40 Cys43	[77]
HiPIP	Cys41 Cys46 Cys61 Cys75	[81]
Hybrid cluster protein	Cys3 Cys6 Cys15 Cys21	[82]
[NiFe] Hidrogenase^a	His185(N) Cys188 Cys213 Cys219	[83]
[FeFe] Hidrogenase^a	His94(N) Cys98 Cys101 Cys107	[78]
proteína IspG	Cys265 Cys 268 Cys 300 Glu307(Oε)	[77]

HiPIP - *high potential iron protein*.

^a Ambas as proteínas contêm mais do que um centro [4Fe-4S], mas na tabela só é representado aquele que tem um modo de coordenação atípico.

Este tipo de cofactores estão dispostos num motivo particular, uma vez que os átomos de ferro estão ligados a cisteínas praticamente adjacentes (Cys-X₂-Cys-X₂-Cys), enquanto o quarto átomo de Fe se encontra ligado a uma cisteína mais distante da cadeia polipeptídica [84]. A ligação de um determinado centro por resíduos de cisteínas de diferentes segmentos da cadeia polipeptídica aparentemente ajudam na estabilização da estrutura terciária da proteína [85].

Os estados de oxidação mais comuns da estrutura cúbica encontrada neste tipo de proteínas são [4Fe-4S]^{3+,2+,1+}, que correspondem respectivamente às combinações de valência [3Fe³⁺-Fe²⁺], [2Fe³⁺-2Fe²⁺] e [Fe³⁺-3Fe²⁺].

Um elevado número de proteínas contendo este tipo de centros têm sido reconhecidas e sabe-se que estão envolvidas na catálise de uma grande variedade de reacções [86].

2. Objectivos

Muitas perguntas permanecem por responder relativamente ao papel biológico da ORP e do seu operão. No entanto, recentemente surgiram as primeiras evidências do envolvimento deste operão na divisão celular. Estudos *de pulldown* endógeno, realizados com a bactéria *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, sugerem que o complexo ORP está relacionado com a localização apropriada do *Z-ring* no centro da célula [46]. A identificação e caracterização das metaloproteínas codificadas por este operão é crucial para determinar com precisão o seu papel funcional na bactéria e a sua importância para os organismos anaeróbios.

Este trabalho tem como objectivo compreender os mecanismos de formação do centro metálico da proteína laranja de *D. alaskensis* G20, bem como a sobreexpressão homóloga das ATPases na estirpe *D. vulgaris* Hildenborough e posterior caracterização bioquímica.

Para atingir os objectivos principais deste trabalho, foi elaborado um plano de trabalhos envolvendo as seguintes etapas:

2.1. Estudo da ORP de *D. alaskensis* G20

- Expressão e purificação da proteína laranja de *D. alaskensis* G20 na forma apo em *E.coli*.
- Reconstituição do centro metálico da apo-ORP recombinante, incubando a proteína com cloreto de cobre e tetratiomolibdato.
- Caracterização bioquímica da holo-ORP reconstituída, por UV-Vis e por plasma de acoplamento indutivo (ICP).
- Compreender os mecanismos de formação do centro metálico através da realização de titulações de UV-Vis com $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ e CuCl_2 na presença/ausência da proteína.

2.2. Estudo das ATPases de *D. vulgaris* Hildenborough

- Expressão homóloga e purificação aeróbia e anaeróbia das ATPases de *D. vulgaris* Hildenborough.
- Identificar possíveis parceiros das ATPases na formação de um complexo com significado fisiológico.
- Proceder à identificação do tipo de centro [Fe-S] presente nestas proteínas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Proteína laranja de *D. alaskensis* G20

O software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível no *Center for Biotechnology Information* (NCBI) foi utilizado para pesquisar a sequência da ORP de *D. alaskensis* G20 (Dde_3198) na base de dados. Para efectuar esta pesquisa utilizou-se a interface *Protein Blast*, seleccionou-se a base de dados *non-reductant protein sequence (nr)* e o algoritmo *blastp (protein-protein BLAST)*. O programa CLUSTALW foi utilizado para realizar o alinhamento múltiplo da sequência da ORP com algumas das sequências mais semelhantes.

3.1.1. Sequenciação do DNA e expressão heteróloga da ORP em *E.coli*

Para a sequenciação do DNA que codifica para o gene *Dde_3198*, correspondente à ORP foram desenhados dois oligonucleótidos iniciadores (*primers*) (Tabela 3.1.) com base na sequência do genoma de *D. desulfuricans* G20, actualmente com a denominação proposta de *D. alaskensis* G20 [87]. A reacção em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada directamente a partir de suspensões celulares fervidas de *Desulfovibrio alaskensis* G20 permitindo a rápida amplificação da sequência seleccionada que codifica para o gene *Dde_3198*. Em seguida descreve-se brevemente o procedimento realizado.

As células de *Desulfovibrio alaskensis* G20 (25 µL) foram ressuspensas em 30 µL de água e a suspensão celular foi incubada num banho de água a 100 °C durante 10 min, seguida de centrifugação a 10 000 rpm durante 10 min. Um volume de 4 µL do sobrenadante foi utilizado como DNA molde e a DNA polimerase *NZYPremium* (NZYTech) foi usada na reacção de amplificação. O PCR decorreu num termociclador (*Biometra*) utilizando o seguinte programa: 95°C durante 5 min, 30 ciclos de 1 min a 95 °C para a desnaturação, seguido por 40 s a 56 °C para o emparelhamento e 1 min e 20 s a 72 °C para o alongamento. Após estes ciclos a mistura

reaccional foi incubada durante 10 min a 72 °C para a extensão final de DNA e arrefecida até 4°C. O produto de PCR foi analisado em gel 1% em agarose, obtendo um fragmento com aproximadamente 0,3 kb que foi purificado utilizando um kit de extracção *QIAquick* (Qiagen). O fragmento de DNA foi directamente sequenciado utilizando o ABI3700 DNA analyzer (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Stabvida, Caparica).

Tabela 3.1. Primers utilizados para a sequenciação do gene da ORP das células de *D. alaskensis* G20.

Primer	Sequência
Forward	5' GGAGGCTAGCATGATCATTGCCATCAGCG 3'
Reverse	5' CGAGGAATTCTTACCAGAGGCCCTGTTTG 3'

O gene que codifica para a ORP, isolado por PCR, foi clonado num vector de expressão pET-21c (Novagen) utilizando as enzimas de restrição *NdeI/EcoRI*. O mapa do vector pET-21c(+) com o gene que codifica para a ORP inserido está representado na Figura 3.1.

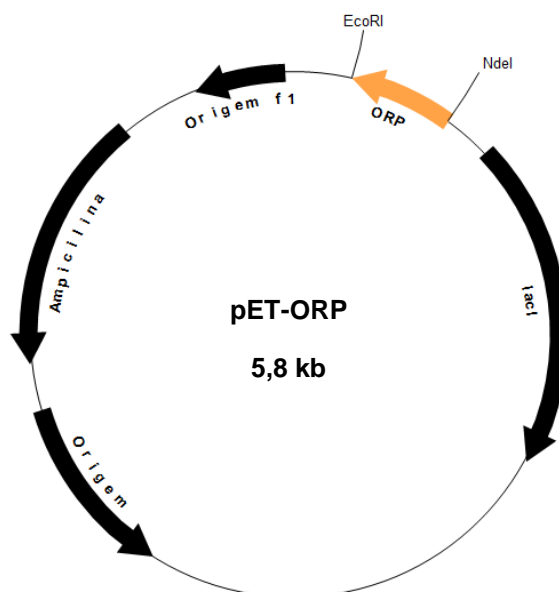


Figura 3.1. Vector de sobreexpressão pET-ORP (5,8 kb). O fragmento de DNA inserido no vector entre as enzimas *EcoRI* e *NdeI* encontra-se representado a laranja. A imagem foi reproduzida utilizando o software *BVTech plasmid*.

Para sobreexpressar o gene que codifica para a ORP de *Desulfovibrio alaskensis* G20, 20 µL de células competentes *E. coli* BL21(DE3) (*Invitrogen*) foram transformadas com 2 µL de DNA plasmídico, de acordo com o protocolo fornecido pela *Invitrogen* [88]. A solução transformante foi plaqueada em placas de meio *Luria Broth* agar (LB agar) suplementadas com 100 µg/mL de ampicilina (*NZYTech*) e incubadas a 37 °C durante 16 horas.

Uma colónia transformante isolada foi seleccionada para o pré-inóculo em 70 mL de meio de cultura LB (*NZYTEch*) contendo 100 µg/mL de ampicilina e posteriormente incubada a 37 °C, durante 16 horas a 225 rpm (num agitador orbital *Shel lab*). Para o crescimento foram preparados 5 L (1 L em cada *erlenmeyer* de 2,5 L) do mesmo meio de cultura, que foram inoculados com a cultura bacteriana na diluição 1:100. As culturas celulares foram incubadas a 37 °C com agitação a 225 rpm (num agitador orbital *Shel lab*) até atingirem a densidade óptica pretendida, ao comprimento de onda de 600 nm, D.O.₆₀₀ = 1. Alcançada a D.O.₆₀₀, seguiu-se a indução da expressão da proteína com a adição de 0,5 mM IPTG (*NZYTEch*).

As células foram recolhidas por centrifugação, após 20 horas, utilizando uma centrífuga *Beckman*, modelo *Avanti J-25i* (rotor JA-10) durante 15 min a 7500 rpm. Removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* celular em tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 contendo inibidor de proteases (*Roche*), na proporção de 1 mL tampão/ g de células recolhidas. As células foram lisadas através de quatro ciclos de congelação/descongelação, com azoto líquido, seguindo-se a lise mecânica utilizando uma célula *French pressure* (*Thermo*). Os restos celulares foram removidos por centrifugação a baixa velocidade durante 20 min a 8000 rpm, numa centrífuga *Sigma*, modelo *3K30*. O sobrenadante foi ultracentrifugado durante 1 hora, a 4 °C, a 45000 rpm, numa ultracentrífuga *Beckman*, modelo *Coulter Optima LE-80K*, (rotor 45Ti) para separar as membranas da fracção solúvel. A expressão da proteína foi analisada por electroforese em gel de 15% em acrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) em tampão de tricina. O método SDS-PAGE foi realizado de acordo com a técnica descrita por *Laemmli* [89].

3.1.2. Purificação da ORP

Todo o procedimento de purificação foi efectuado a 4 °C, utilizando um sistema de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) *AKTAprius plus* (*GE Healthcare*) e a absorvância monitorizada ao c.d.o de 280 nm. Todas as amostras foram centrifugadas a 9000 rpm durante 15 min a 4 °C, numa centrífuga *Sigma*, modelo *3K30*, de forma a retirar possíveis partículas em suspensão. A pureza da proteína após cada etapa foi seguida por electroforese em gel de 15% em acrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

A fracção solúvel, previamente concentrada num *diaflow* com membrana YM-5 (*cut-off* 5 kDa, *Millipore*), foi aplicada numa coluna de exclusão molecular, *Superdex 75* (*Amersham*, 2,6 cm diâmetro (Ø) × 70 cm), equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,6 e eluída na mesma solução tamponante a um fluxo de 2 mL/ min. A fracção recolhida contendo a proteína foi concentrada e posteriormente dialisada (numa fita de diálise *Medicell*, com *cut-off* de 3,5 kDa) contra tampão 5 mM Tris-HCl pH 7,6 a 4 °C durante 16 horas.

Na segunda etapa de purificação realizou-se uma cromatografia de permuta iónica utilizando a coluna *Source-Q15* (*Amersham*, 2,6 cm Ø x 20 cm), equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,6. Após a aplicação da amostra na coluna, as proteínas que não possuem capacidade de se ligar à fase estacionária foram eluídas na mesma solução tamponante. A eluição das proteínas adsorvidas à resina foi efectuada através de um gradiente linear de eluição em 10 mM Tris-HCl pH 7,6, de 0 a 700 mM NaCl, durante 2 horas, com um fluxo de 1,5 mL/min. As fracções contendo a ORP identificadas por SDS-PAGE foram reunidas e posteriormente concentradas utilizando um *diaflow* (*cut-off* 5 kDa, *Millipore*).

A purificação desta proteína exigiu uma etapa adicional de purificação, que foi efectuada por cromatografia de exclusão molecular, utilizando uma coluna *Superdex 75* pré-empacotada (*Amersham*, 1 cm Ø x 30 cm). Nesta etapa, a coluna foi equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,6 e a amostra foi eluída no mesmo tampão, com um fluxo de 0,5 mL/min. As fracções de interesse foram reunidas e a amostra foi dialisada (numa fita de diálise *Medicell*, com *cut-off* de 3,5 kDa) contra tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,6, a 4 °C, durante 16 horas e, posteriormente, guardada a - 80°C. Na Figura 3.2 é apresentado um diagrama esquemático do processo de purificação.

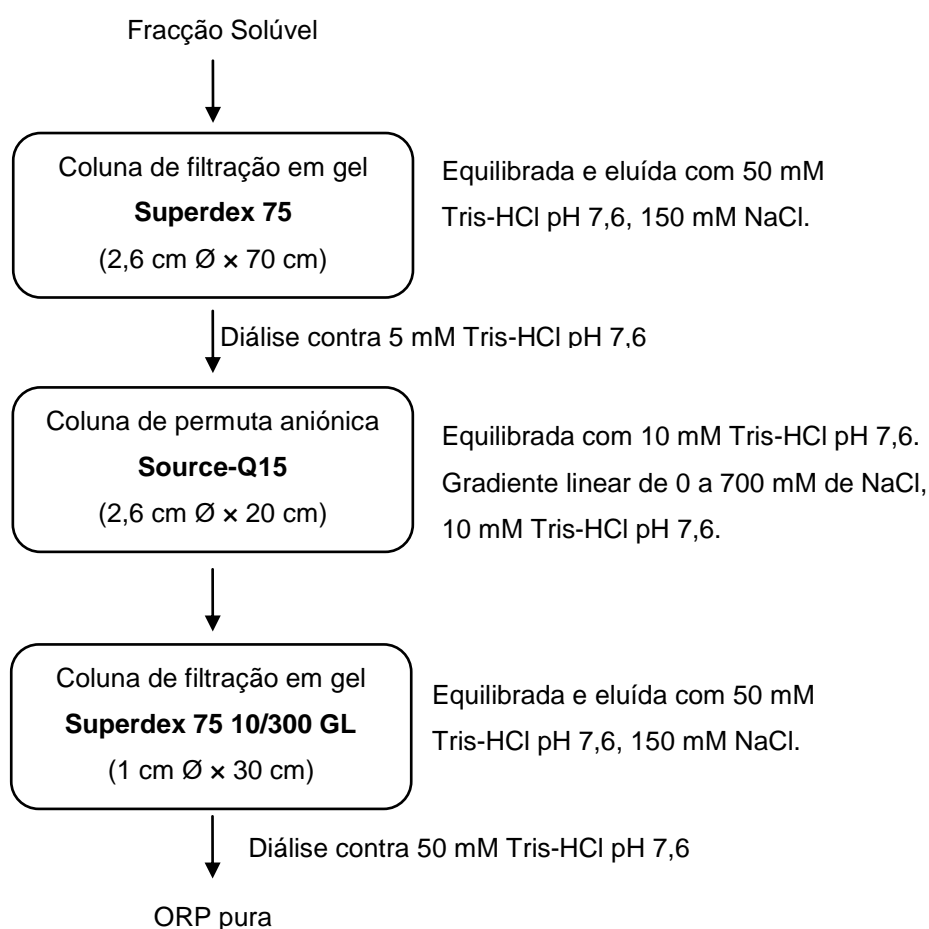


Figura 3.2. Esquema do processo de purificação da ORP recombinante.

3.1.3. Determinação do coeficiente de extinção molar

O método colorimétrico que utiliza o ácido bicinconínico (BCA) consiste na detecção e quantificação colorimétrica de proteínas totais. Este método combina duas reacções: a redução do cobre ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$) pela proteína em meio alcalino (reacção de biureto) e a coordenação do ião Cu^+ a duas moléculas do reagente BCA, originando uma solução de cor púrpura. Na reacção forma-se um complexo molecular que exhibe um máximo de absorvância a 562 nm.

Para este procedimento foi utilizado o Kit *Bicinchoninic Acid Assay* (Sigma) de acordo com o protocolo comercial [90]. A proteína utilizada como padrão foi a Albumina de Soro Bovino (BSA) preparada com concentrações entre 0 e 280 $\mu\text{g/mL}$ a partir da solução *stock* 1 mg/ mL. Foi adicionado a todas as amostras 1 mL do reagente BCA (solução 4% de sulfato de cobre (II) pentahidratado e solução de ácido bicinconínico na proporção 1:50) e incubou-se durante 30 min a 37 °C. A leitura da absorvância a 562 nm, utilizando um espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) permitiu representar as absorvâncias obtidas em função das concentrações das proteínas padrão (Figura 3.3). A equação obtida $\text{Abs} = 2,015 [\text{proteína}]$, com $R^2 = 0,996$, foi utilizada para determinar a concentração de proteína na solução inicial e o coeficiente de extinção molar.

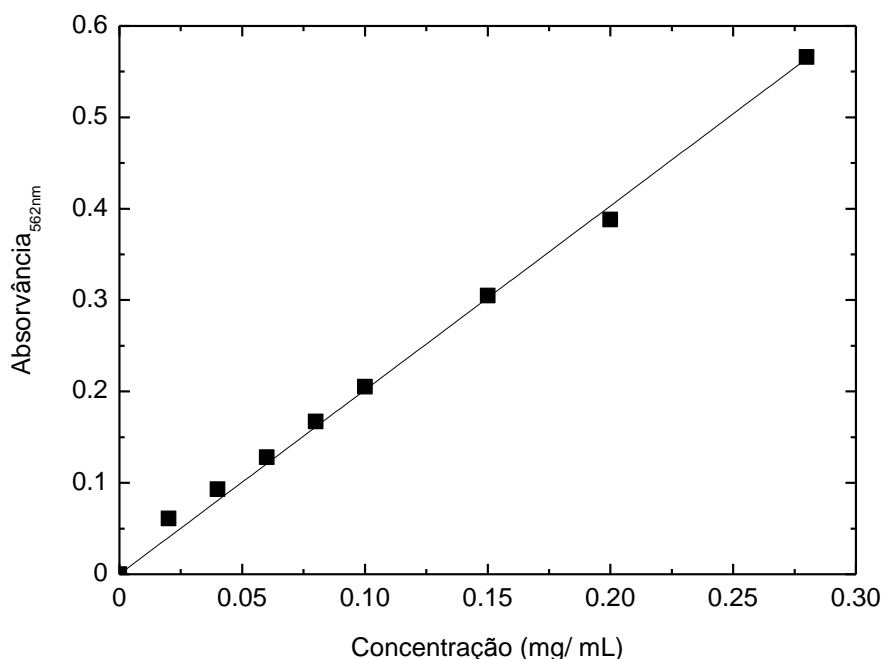


Figura 3.3. Representação da curva de calibração correspondente às absorvâncias das soluções padrão de BSA obtidas em função da sua concentração ($\text{Abs} = 2,015 [\text{proteína}]$, com $R^2 = 0,996$).

3.1.4. Sequência do N-terminal da ORP

O N-terminal foi determinado com degradação de Edman automatizada num *Applied Biosystem model 491 protein sequencer*. A degradação de Edman é um método de marcação e clivagem do aminoácido terminal sem haver hidrólise das ligações peptídicas entre os outros aminoácidos. Nesta reacção é removido sequencialmente um aminoácido do péptido, em vários ciclos até se revelar a sequência completa do péptido original. Para a determinação foi utilizado, aproximadamente, 0,5 nmol de ORP.

3.1.5. Determinação da massa molecular

3.1.5.1. Determinação por espectrometria de massa

A massa molecular da ORP isolada foi determinada por espectrometria de massa ESI – TOF, utilizando um espectrómetro *Burker microTOF*. Nesta técnica de ionização a amostra é transmitida através de um capilar a alta voltagem, para que disperse electrostaticamente (*electrospray*) gotículas muito pequenas que rapidamente evaporam transmitindo a sua carga à proteína. As moléculas são posteriormente transferidas para um espectrómetro de massa microTOF (*time of flight*), sendo detectadas individualmente de acordo com a razão carga/massa.

3.1.5.2. Determinação por filtração em gel

A massa molecular da ORP na forma *apo* foi também determinada por cromatografia de exclusão molecular utilizando uma coluna Superdex 75 10/300 GL (*GE Healthcare*) equilibrada em 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6 com fluxo de 0,4 ml/ min. Um volume de 100 µl contendo uma mistura das proteínas padrão foi injectado na coluna. De seguida, foi também aplicada a amostra contendo a proteína em estudo (100 µl). As proteínas padrão, constituintes do kit de calibração por filtração em gel *LMW (GE Healthcare)*, utilizadas foram: Conalbumina (75 kDa); Ovalbumina (43 kDa); Anidrase carbónica (29 kDa); Ribonuclease A (13,7 kDa) e Aprotinina (6,5 kDa). Para a determinação do volume morto da coluna aplicou-se isoladamente o azul de Dextrano.

Para o cálculo da massa molecular foi representado o K_{av} (coeficiente de partição entre as fases cromatográficas) em função do logaritmo das massas moleculares das proteínas padrão.

O K_{av} foi determinado utilizando a seguinte fórmula: $K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$

Com, V_e = volume de eluição da proteína;

V_o = volume "morto" da coluna = volume de eluição do Azul Dextrano 2000

V_t = volume total da coluna.

Os volumes de eluição foram obtidos determinando o volume de solvente entre o ponto de injeção e o de altura máxima do pico correspondente à eluição das proteínas utilizadas (proteínas padrão e ORP).

3.1.6. Reconstituição do centro metálico da ORP

O centro metálico da *apo*-proteína recombinante foi reconstituído utilizando soluções de CuCl_2 (*Merck*) e $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ (*Sigma*) em tampão 50 mM Tris-HCl 20 % DMF (N,N-dimetilformamida) (*Sigma*), pH 7,6. A *apo*-ORP foi incubada com soluções de metais na razão 1ORP:2Cu:4Mo. A mistura reaccional foi incubada a 4 °C durante 15 minutos e de seguida foi aplicada numa coluna PD-10 de *desalting* (*GE Healthcare*), equilibrada com 50 mM Tris-HCl pH 7,6. A proteína foi eluída na mesma solução tamponante. A amostra foi concentrada numa unidade de filtração, com uma membrana de 5kDa, e aplicada (500 µL) numa coluna de filtração em gel Superdex 75 (*Amersham*, 1,6 Ø x 60 cm) previamente equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6. A ORP foi eluída a um fluxo de 1mL/ min utilizando o mesmo tampão. O espectro UV-Vis foi adquirido num espectrofotómetro *Shimadzu UV-1800*.

Para determinar a massa molecular da holo-ORP foram aplicadas na coluna proteínas padrão (500 µL): Aprotinina (6,5 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa), Anidrase carbónica (29 kDa), Ovalbumina (43 kDa) e Albumina de Soro Bovino (66 kDa) (*GE Healthcare*). O procedimento foi realizado de acordo com o *kit* de calibração de baixo peso molecular (LMW) (*GE Healthcare*), disponível comercialmente [91].

A quantificação dos metais, molibdénio e cobre, presente na proteína reconstituída, foi analisada por ICP num instrumento *Jobin-Yvon* (Ultima), no Laboratório de Análises *Atomic Emission Spectroscopy service* da FCT/UNL. Para a realização da análise foi utilizado o Reagecom 23 multielements ICP como solução padrão, numa gama de concentrações de 0,05 a 3 ppm.

A determinação do coeficiente de extinção molar foi realizada de acordo com o procedimento na secção 3.1.3. Materiais e métodos.

3.1.7. Titulações de UV-Vis da apo-ORP com Mo e Cu

A incorporação dos metais molibdénio e cobre, no centro metálico da apo-ORP foi monitorizada por espectroscopia UV-Vis entre os c.d.o. 250 e 800 nm, utilizando um espectrofotómetro *Diode array* (Shimadzu). Para efectuar esta incorporação utilizou-se CuCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$, em 20% DMF, pH 7,6. Primeiro, incubou-se a apo-ORP com CuCl_2 na razão 1Cu:1ORP numa cuvete de quartzo de 1 cm de percurso óptico, com agitação contínua e titulou-se com uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ até se obter a razão 1ORP:1Cu:4Mo. De forma análoga, foi realizada a titulação inversa, ou seja, a apo-ORP foi inicialmente incubada com $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ na razão 1ORP:2Mo, e posteriormente titulada com CuCl_2 . Para compreender a influência da proteína na formação do seu centro metálico, titulou-se ambos os metais, CuCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$, um com o outro na ausência desta.

3.2. Operação *ORP* de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

3.2.1. Análise bioinformática do Operação

A identificação dos domínios das proteínas deste operação foi efectuada com E-value<0,01, através do *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART) e da *Database of protein domains, families and functional sites* (PROsite). Também foi utilizada a base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), para identificar os domínios e família de proteínas a que pertencem através da ferramenta online *conserved domain database* (CDD).

3.2.2. Expressão homóloga das ATPases de *D. vulgaris* Hildenborough

O vector de expressão pBMC6 foi utilizado para clonar o operação *ORP1* de *D. vulgaris* Hildenborough que compreende os genes *DVU2103*, *DVU2104* e *DVU2105*. No gene *DVU2103* foi introduzida uma tag de 8 histidinas.

Foram desenhados *primers* necessários para proceder ao isolamento do operão *ORP1* (*DVU2103*, *DVU2104* e *DVU2105*) por PCR, com inclusão das sequências de reconhecimento para as enzimas de restrição *NdeI* e *SacI*. O produto de PCR foi hidrolisado com as enzimas de restrição *NdeI* e *SacI* e purificado. Posteriormente foi subclonado no pBMC6, previamente digerido com as enzimas apropriadas. O plasmídeo resultante, contendo um promotor C3 e um gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol foi transferido para células *E.coli* MW3064 e posteriormente transferido para *D. vulgaris* Hildenborough por transferência conjugacional de genes. As células contendo os genes recombinantes no cromossoma foram seleccionadas pela resistência ao tianfenicol (análogo ao cloranfenicol). A clonagem dos genes no vector e a transformação do plasmídeo em células *D. vulgaris* Hildenborough foi efectuada em colaboração com o grupo da Prof. Corinne Aubert do CNRS em Marselha.

O mapa do vector de sobreexpressão pBMC6 com os três genes *DVU2103* contendo a His-tag, *DVU2104* e *DVU2105* inseridos (8 Kb) encontra-se apresentado na Figura 3.4.

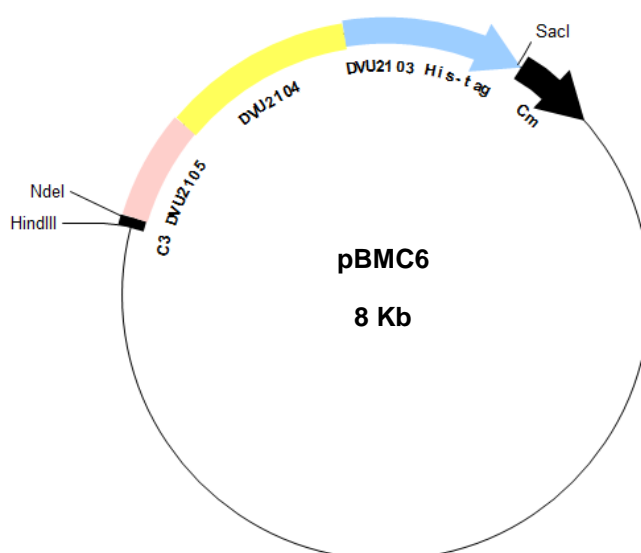


Figura 3.4. Vector de sobreexpressão pBMC6 com os três genes *DVU2103*, *DVU2104* e *DVU2105* inseridos (8 Kb). A clonagem dos genes de interesse foi efectuada entre os sítios de restrição para *NdeI* e *SacI*. O vector possui um promotor C3 (citocromo c3) e um gene (cm) que confere resistência ao cloranfenicol.

A suspensão bacteriana foi repicada (1:10) para um frasco anaeróbio (5 mL), contendo meio de cultura *Postgate C* [92], preparado de acordo com a composição apresentada na Tabela 3.2, e 20 µg/ mL de tianfenicol (*Sigma*). O inóculo foi incubado a 33 °C sem agitação, durante 24 horas. A cultura foi repicada gradualmente para frascos anaeróbios de dimensões superiores.

Tabela 3.2. Composição do meio Postgate C. O pH do meio foi ajustado para pH 7,4.

Composto	Concentração (g/L)
KH_2PO_4	0,50
NH_4Cl	1,00
Na_2SO_4	4,50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,06
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,06
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,004
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,30
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	0,10
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{S}$	0,10
$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 \cdot \text{Na}$ (Lactato de sódio)	0,5%
Extracto de levedura	1,00

Para o crescimento em frascos anaeróbios de 2 L, verificou-se previamente a pureza da cultura através do microscópio óptico (*Olympus-BX51*), utilizando luz branca e uma amplificação de 1000x. Após confirmação da presença da monocultura, a suspensão celular foi diluída (1:10) para frascos anaeróbios e o crescimento foi iniciado nas mesmas condições. A D.O.₆₀₀ foi medida em intervalos de tempo regulares, por forma a seguir a curva de crescimento.

Para a expressão homóloga dos genes codificados no vector de expressão, o crescimento foi parado após 24 h e o meio de cultura foi centrifugado a 7500 rpm, durante 15 min a 4 °C, numa centrífuga *Beckman*, modelo *Avanti J-25i* (rotor JA-10). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular resultante foi ressuscitado em solução tampão 10 mM Tris-HCl, 1 mM PMSF (inibidor de proteases), pH 7,6, com uma proporção aproximada de 1 mL/ g de células recolhidas.

O homogenizador (*Avastin*) foi utilizado para lisar as células, seguindo-se uma centrifugação a 8000 rpm, durante 20 min a 8 °C, numa centrífuga *Sigma*, modelo *3K30*. O sobrenadante foi ultracentrifugado durante 1 hora a 45000 rpm, numa ultracentrífuga *Beckman Coulter Optima*, modelo *LE-80K* (rotor 45Ti), com o objectivo de separar a fracção solúvel da membrana. A expressão das proteínas foi analisada por electroforese em gel de 12,5% em acrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

3.2.3. Purificação sob atmosfera aeróbia e anaeróbia

Inicialmente a purificação das ATPases foi realizada sob atmosfera aeróbia e a pureza das proteínas após cada etapa foi seguida por electroforese em gel de 12,5% em acrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

A amostra foi aplicada numa coluna de afinidade, His-trap (*Ge Healthcare*, 1,6 cm Ø x 2,5 cm), equilibrada com tampão 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7,4. A

elução das proteínas que têm afinidade para a coluna foi efectuada na presença de 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7,4. A fracção eluída, contendo as proteínas de interesse foi aplicada numa coluna PD-10 (*GE Healthcare*) para retirar o imidazole e proceder à troca de tampão para 20 mM Tris-HCl pH 7,6.

Posteriormente, foi realizado um novo crescimento celular (12 L) para purificação em anaerobiose. Na impossibilidade de realizar a lise celular e subseqüentes centrifugações em anaerobiose, minimizou-se o contacto com oxigénio, nomeadamente através da utilização de soluções desarejadas e também do desarejamento do extracto proteico antes e após as centrifugações. As proteínas de interesse produzidas foram purificadas sob atmosfera de argón na câmara anaeróbia (*Burker*). A pureza das proteínas após cada etapa foi seguida por electroforese em gel de 12,5% em acrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

O processo foi iniciado com uma cromatografia de afinidade, utilizando a coluna His-Trap 5 mL (*GE Healthcare*, 1,6 cm Ø × 2,5 cm). A amostra foi aplicada na coluna, previamente equilibrada com tampão 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole, pH 7,4. As proteínas que não se ligam à matriz foram rapidamente eluídas na mesma solução tamponante. De forma a eluir as proteínas ligadas à coluna efectuou-se um gradiente de eluição por etapas em 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7,4 e duas concentrações diferentes de imidazole (100 e 500 mM). A fracção contendo a proteína foi colectada e concentrada por pressão numa unidade de filtração *vivacell 100* (com *cutt-off* de 5 kDa), que foi introduzida na câmara anaeróbia. A fracção concentrada foi aplicada numa coluna de *desalting* PD-10 (*GE Healthcare*), equilibrada com 50 mM Tris-HCl pH 7,6, por forma a trocar o tampão.

De seguida, aplicou-se a fracção recolhida numa coluna de permuta iónica, Resource Q 1 mL (*GE Healthcare*, 6,4 mm Ø × 30 mm), previamente equilibrada com 20 mM Tris-HCl, pH 7,6. As proteínas que se ligam à coluna foram eluídas através de um gradiente descontínuo, com 20 mM Tris-HCl pH 7,6 e diferentes concentrações de NaCl (50, 100, 200, 300, 400 e 600 mM). O diagrama esquemático do processo de purificação anaeróbio é apresentado na Figura 3.4.

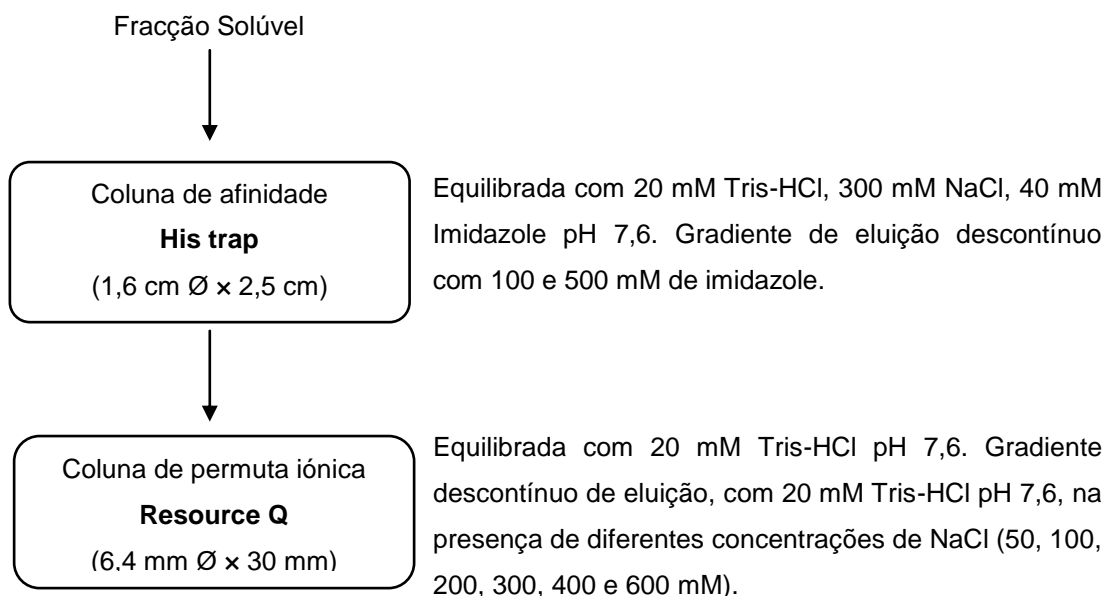


Figura 3.4. Esquema do processo de purificação das ATPases de *D. vulgaris* Hildenborough.

3.2.4. Caracterização Bioquímica

3.2.4.1. Espectroscopia UV-Vis

Os espectros UV-Vis das etapas de purificação foram adquiridos num espectrofotómetro *Shimadzu UV-1800*. Todos os espectros foram obtidos à temperatura ambiente e na ausência de oxigénio, utilizando cuvetes de quartzo de 1 cm. A absorvância foi monitorizada a cada 0,5 nm entre os comprimentos de onda 250 e 800 nm.

3.2.4.2. Espectrometria de massa

No decurso do processo de purificação, as bandas observadas no gel SDS-PAGE foram identificadas por espectrometria de massa. As bandas de interesse foram extraídas directamente do gel SDS-PAGE, com um bisturi, e hidratadas em 100 µl de água milli-Q. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Análises *Mass Spectroscopy service* da FCT/UNL, onde foi efectuada a análise de péptidos para identificação das proteínas.

O tratamento das amostras foi efectuado através de diversas lavagens com água e com solventes orgânicos, de forma a remover todo o corante do gel. Após este tratamento as

amostras foram digeridas, durante 16 horas, com a enzima proteolítica tripsina. Os péptidos resultantes da proteólise foram extraídos com acetonitrilo e posteriormente secos sobre vácuo. De seguida, os péptidos foram dissolvidos em pequenas quantidades de água destilada, concentrados e dispersos numa matriz. As amostras foram colocadas numa placa de MALDI, que após evaporação do solvente originaram co-cristais. A análise de péptidos para identificação de proteínas foi efectuada no MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry*) da *Applied Biosystems*. A placa foi inserida na câmara de vácuo e os cristais foram irradiados por um feixe laser. A análise espectrométrica de massa resultou numa lista de picos correspondentes às massas moleculares dos péptidos. As massas moleculares obtidas foram introduzidas no motor de busca MASCOT *peptide mass fingerprint* (*Matrix science*), utilizando a modificação fixa carbamidometil e a modificação variável oxidação, para a identificação das proteínas nas bases de dados do NCBI e do Swiss Prot.

3.2.4.3. Determinação do coeficiente de extinção molar

A concentração de proteína foi determinada através do método de BCA, utilizando o Kit *Bicinchoninic Acid Assay* (*Sigma*) de acordo com as instruções do fabricante [90]. A preparação das amostras foi realizada de acordo com a descrição da secção 3.1.3. Materiais e métodos. A leitura da absorvância ao comprimento de onda 562 nm, num espectrofotómetro (*Shimadzu UV-160A*) permitiu a representação das absorvâncias obtidas em função da concentração das soluções padrão (representada na Figura 3.5). A equação da recta obtida, $\text{Abs} = 2,399 [\text{proteína}] + 0,028$, com $R^2 = 0,99$, foi utilizada como referência para determinar a concentração de proteína na solução inicial e o coeficiente de extinção molar ao c.d.o. 400 nm.

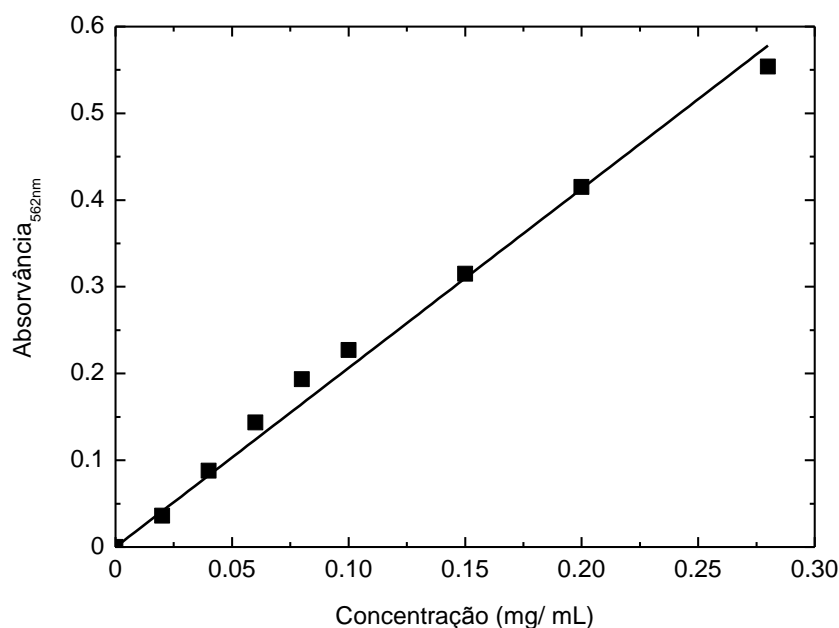


Figura 3.5. Representação da curva de calibração correspondente às absorvâncias das soluções padrão de BSA obtidas em função da sua concentração ($\text{Abs} = 2,399 [\text{proteína}] + 0,028$, com $R^2 = 0,99$).

4. Resultados e Discussão

4. 1. Proteína laranja de *Desulfovibrio alaskensis* G20

Através da interface *Blastp* disponível na base de dados do NCBI foi possível analisar a sequência de aminoácidos, da ORP de *D. alaskensis* G20, produto do gene Dde_3198. A pesquisa de semelhanças entre sequências em genomas sequenciados ou parcialmente sequenciados foi realizada e revelou que ORP de *D. alaskensis* G20 é uma proteína conservada no género *Desulfovibrio*. Esta proteína apresenta maior semelhança com a proteína conservada de *D. africanus* Walvis Bay, *D. salexigens* DSM 2638 e com a proteína hipotética de *D. vulgaris* Hildenborough, ambas com identidades respectivas de 59%, 57% e 59%. A partir do alinhamento de sequências foi também possível identificar que a ORP de *D. gigas*, a única reportada até à data, apresenta uma identidade de 41% com a ORP de *D. alaskensis* G20.

A análise efectuada, revelou também que a ORP não é uma proteína exclusiva de bactérias redutoras de sulfato, apresentando similaridade com proteínas de géneros diferentes como a proteína conservada da bactéria anaeróbica termofílica *Thermosinus carboxydivorans* Nor1, a proteína hipotética de *Pelobacter thermopropionicum* SI e a proteína conservada de *Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB, com identidades de 50%, 49%, e 44% respectivamente. A ORP de *D. alaskensis* G20 foi também identificada como semelhante a proteínas do domínio *archaea*, apresentando uma identidade de 42% com a proteína conservada de *Methanohalobium evestigatum* Z-7303. Das sequências mais semelhantes foram seleccionadas para alinhamento seis, através do alinhamento múltiplo de sequências no CLUSTALW2, representado na Figura 4.1.

```

D.alaskensis      -MIIAISASGQSPESGLDPRFGRAGFVLFNSETGQFSYKDNTQNLNAPQGAGIQAAAMNV 59
D.africanus       -MKIAVSTQGNGLDSPLDPRFGRASGFMIVDSDTLEHTYVPNEQNMNLPQGAGIQAAQCV 59
D.vulgaris H.     -MRIVITAQGNLTDSPLDPRFGRARSFIVCDTETGATHAVDVSANMNLAQGAGIQAAQMA 59
P.thermoprop.     -MKVAITSQGESLESMLDQRFGRCGWFVVADTEEGNWEAVSNEQNLSSAQGAGIQSAETV 59
D.gigas           MQRIAVTAEGPGLDGLVDPRFGRAGFVVDAATMAAEYVDNGASQTLSHGAGINAAQVL 60
M.evestigatum     -MIIGITAKGKNLDEPLDPRFGRSQYIVLADSESMFEFVFENPGE-SAPGGAGIKAAQAI 58
                  : : : : * : : * * * * . : : : : . . . * * * * : : *

D.alaskensis      ADAGASAVITGHVGPKAFAQALQQGNVAVYLT-DSPTVHDALEAFRQGMRLPADQADKQGH 118
D.africanus       ANAGAKAVITGHVGPKAYVALDRGKIAYYLR-DGGTAREALEAFKAGSLAQAGGPKDGH 118
D.vulgaris H.     ADAGAEAVITGHVGPKAFTALNRGHIAYYLC-DLATPREALAAFIEGKLRPADTADREGH 118
P.thermoprop.     CRCGAEAVITGHVGPKAFAKVLNAAAGIKVYCC-TGGTVAEAELEKFKKGELKETLEANVEGH 118
D.gigas           AKSGAGVLLTGYVGPKAFAQALQAAGIKVGQDLEGLTVRQAVQRFLDGQVPMAGPNK--- 117
M.evestigatum     VDKDIDALITGNVGENAFSVLSKANINVTG-ASGTIRKAIDDFKAGLLDEPDAPT VKAH 117
                  . . : : * * * * : : * . * . : * * * . * : * * : . .

D.alaskensis      W---- 119
D.africanus       W---- 119
D.vulgaris H.     W---- 119
P.thermoprop.     WI--- 120
D.gigas           -----
M.evestigatum     NGMNR 122

```

Figura 4.1. Alinhamento da sequência da ORP de *D. alaskensis* G20 (Dde_3198) com as ORPs de *D. africanus* Walvis Bay, *D. vulgaris* Hildenborough, *Pelobacter thermopropionicum* SI, *D. gigas* e *Methanohalobium evestigatum* Z-7303. As sequências foram obtidas através da interface *Blastp* e o alinhamento foi realizado na plataforma *clustalW2*.

O alinhamento entre diferentes sequências permite a identificação de regiões conservadas importantes do ponto de vista funcional/estrutural. No centro metálico da ORP de *D. gigas*, o molibdênio e o cobre são coordenados exclusivamente por átomos de enxofre. Para que o centro metálico estabeleça uma ligação covalente com a cadeia polipeptídica da proteína teria de se ligar a resíduos de cisteínas ou metioninas. Como se pode observar na sequência de aminoácidos da ORP de *D. alaskensis* G20, tal como em *D. gigas* (Figura 4.1), não existe qualquer resíduo de cisteína na sequência. Existem três resíduos de metioninas na sequência, no entanto, com a exceção da metionina inicial estas não são conservadas. Este resultado corrobora os resultados de EXAFS observados para *D. gigas*, que indicam que a ligação do centro metálico provavelmente não ocorre através das metioninas, uma vez que para este tipo de ligação são expectáveis distâncias de ligação metal-enxofre inferiores às observadas por EXAFS na ORP [35]. A ausência de resíduos de cisteínas, previamente constatado em *D. gigas*, permitiu inferir relativamente ao tipo de ligação estabelecida entre o centro metálico e a proteína, sugerindo que o centro não está ligado covalentemente à cadeia polipeptídica da proteína [35][36].

A ORP de *D. alaskensis* G20 encontra-se inserida num operão designado por operão da ORP (Figura 4.2).



Figura 4.2. Esquema representativo da disposição dos genes no operão da ORP em *D. alaskensis* G20.

Este operão em *D. alaskensis* G20 é constituído por um gene (*Dde_3196*) que codifica para uma proteína reguladora e por uma unidade transcripcional que possui seis genes estruturais que codificam para proteínas na sua maioria conservadas, nos operões da ORP disponíveis nas bases de dados a partir de genomas completos sequenciados. Este operão apesar de possuir os mesmos genes identificados em *D. vulgaris* Hildenborough (Figura 1.7, secção 1.6. Introdução) possui com uma organização génica diferente, uma vez que em *D. vulgaris* foi possível identificar um regulador e duas unidades transcripcionais com direcções opostas (*ORP1* e *ORP2*). Apesar da diferente disposição dos genes no operão, observada para estes dois microorganismos, estes são conservados em ambos.

4.1.1. Expressão heteróloga da ORP em *E.coli*

Os testes de sobre-expressão realizados em meio LB/ ampicilina apontam como melhores condições para a sobre-expressão da proteína, a incubação a 37 °C sob agitação a 225 rpm durante 16 horas, após a indução com 0,5 mM IPTG, quando a cultura atinge a D.O.₆₀₀ de 1. Efectuou-se um crescimento em larga escala (5 L) em meio LB/ Ampicilina para ORP, nas condições optimizadas (ver secção 3.1.1. Materiais e métodos).

Na Figura 4.3 encontra-se apresentado o perfil de produção da proteína, num gel SDS-PAGE 15% em acrilamida, em tampão de tricina. Os resultados obtidos mostram uma banda intensa a 12 kDa (poço 2) indicando que a proteína de interesse é expressa na forma solúvel. A mobilidade electroforética da proteína no gel está de acordo com a massa teórica estimada (12443,8 Da) com base na sequência de aminoácidos, prevista através da interface *ProtParamTool* (*ExPASy*).

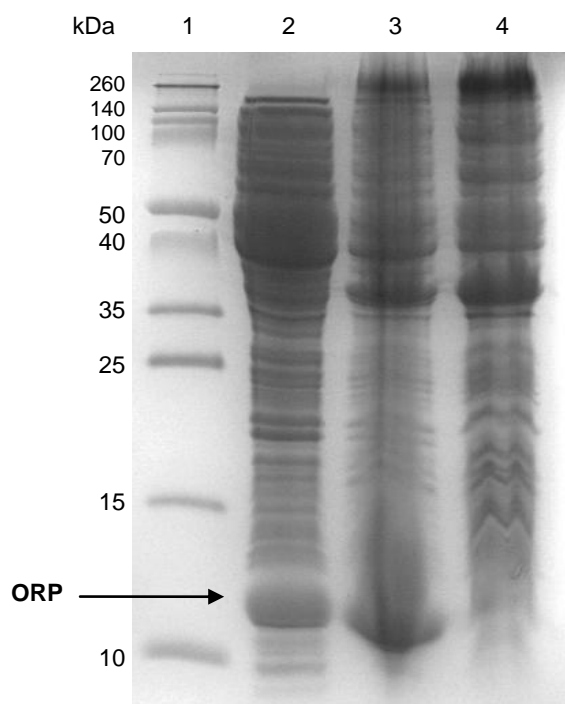


Figura 4.3. Perfil de expressão de ORP por SDS-PAGE: 1. marcador de massas moleculares; 2. fracção solúvel depois da expressão da ORP em *E.coli*; 3. restos celulares; 4. fracção membranar.

4.1.2. Purificação da ORP

A purificação da ORP envolveu três etapas, tal como descrito na secção 3.1.2. Materiais e Métodos. Na primeira etapa de purificação realizou-se uma cromatografia de exclusão molecular (Superdex 75 xk26, GE) de forma a separar os contaminantes de maior massa molecular. O perfil cromatográfico obtido encontra-se representado na Figura 4.4.

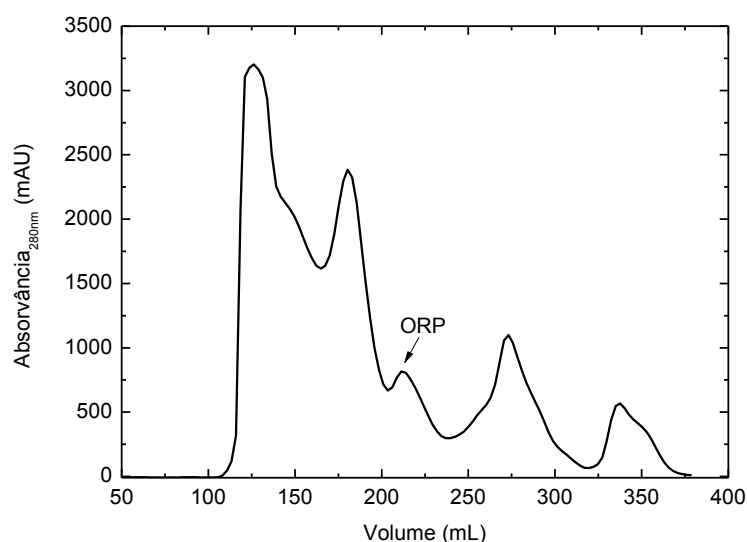


Figura 4.4. Perfil cromatográfico da ORP eluída numa coluna *Superdex 75 XK26* (GE). A amostra foi eluída em 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,6 e a absorvância monitorizada a 280 nm. O máximo de absorvância da fracção contendo a proteína de interesse encontra-se assinalado.

As fracções recolhidas foram analisadas em gel SDS-PAGE, permitindo identificar que a ORP foi eluída na fracção correspondente ao volume de eluição entre 195 e 230 mL.

Na etapa seguinte de purificação foi utilizada uma coluna de permuta aniónica. O ponto isoeléctrico da proteína, estimado com base na sequência de aminoácidos utilizando a aplicação *ProtParamTool* (*ExPASy*) é 5,39. Os grupos carregados das cadeias laterais dos aminoácidos aspartato e glutamato conferem à proteína uma carga negativa a pH 7,6, o que vai possibilitar a interacção desta com a matriz da coluna carregada positivamente.

Na Figura 4.5 é apresentado o perfil de eluição da coluna cromatográfica *Source 15Q*, utilizada para purificar a ORP através da aplicação de um gradiente linear de 0 a 700 mM de NaCl. A fracção contendo a ORP foi eluída da coluna entre os volumes 517 e 532 mL, com aproximadamente 500 mM NaCl.

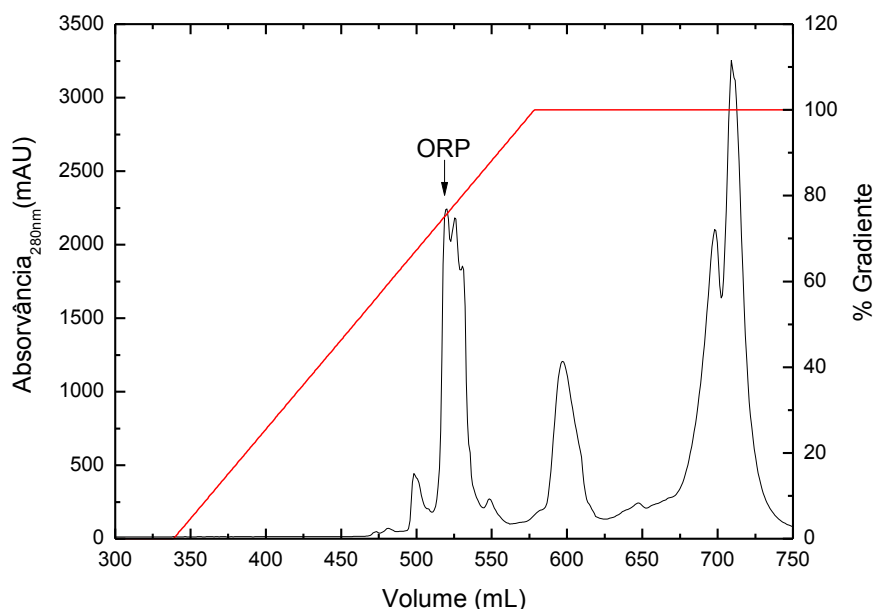


Figura 4.5. Perfil cromatográfico da eluição da ORP, utilizando a coluna *Source 15Q*. A absorvância foi monitorizada a 280 nm (cor preta). O gradiente linear foi efectuado em 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 de 0 a 700 mM NaCl (cor vermelha). A ORP foi eluída com aproximadamente 500 mM NaCl, pH 7,6. O máximo de absorvância da fracção contendo a proteína de interesse encontra-se assinalado.

Na terceira etapa de purificação foi utilizada novamente uma cromatografia de exclusão molecular, em coluna pré-empacotada (*Superdex 75 10/300 GL*, GE) de maior resolução com o objectivo de obter a proteína pura, num último passo de refinamento. Os resultados obtidos por SDS-PAGE de cada uma das etapas de purificação são apresentados na Figura 4.6.

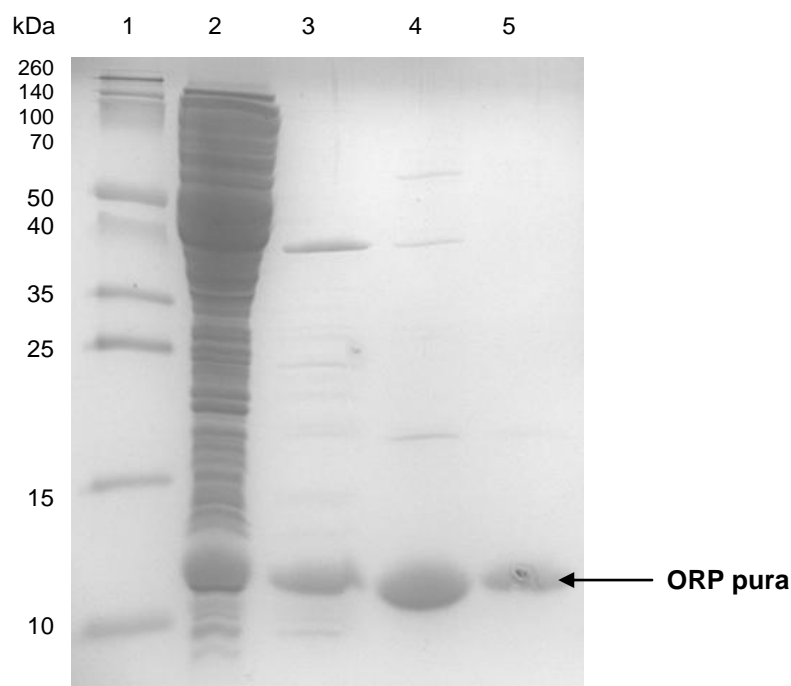


Figura 4.6. Análise SDS-PAGE das etapas de purificação da ORP de *D. desulfuricans* G20: 1. marcador de massas moleculares; 2. fracção solúvel após expressão da ORP em *E.coli*; 3. após coluna *Superdex* 75; 4. após coluna *Source* 15 Q; 5. após *Superdex* 75 10/300 GL.

A análise do gel SDS-PAGE revela que a coluna de filtração em gel, utilizada na primeira etapa (poço 3) é extremamente eficaz no processo de purificação, pois a proteína encontra-se significativamente mais pura. A segunda etapa de purificação (poço 4) permitiu aumentar o grau de pureza da ORP e por último foi realizada uma etapa de refinamento (poço 5) que eliminou os contaminantes de mais alta massa molecular, permitindo obter a proteína pura.

Durante todo o processo de purificação não foi observada cor na fracção contendo a proteína, indicando que a ORP recombinante é expressa na forma de apo-proteína, isto é, sem a presença do centro metálico. O espectro UV-Vis da ORP pura, representado na Figura 4.7, e confirma que ORP se encontra na forma apo.

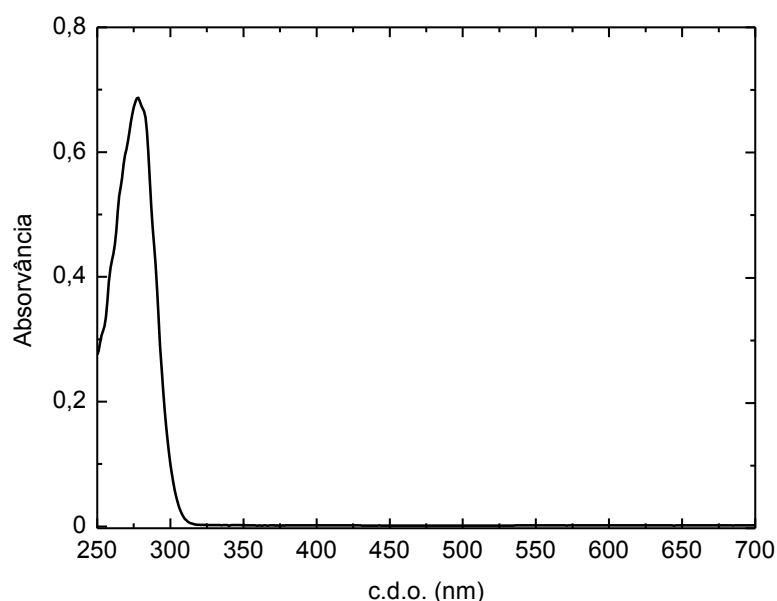


Figura 4.7. Espectro UV-Vis da ORP recombinante de *D. alaskensis* G20 em 50 mM Tris-HCl pH 7,6.

4.1.3. Determinação do coeficiente de extinção molar da ORP

A absorção da radiação pelas proteínas na região do ultravioleta depende do seu conteúdo em três aminoácidos: tirosinas (Tir) e triptofanos (Trp), pois estes possuem anéis aromáticos e têm um máximo de absorção a 280 nm e do conteúdo em cistinas.

O coeficiente de absortividade molar foi determinado com base na lei de Lambert-Beer que mostra que $A = \varepsilon \times c \times b$, sendo A a absorvância, ε o coeficiente de extinção molar, c a concentração da amostra e b o percurso óptico. A quantificação de proteína obtida pelo método BCA (secção 3.1.4. Materiais e métodos) permitiu determinar o coeficiente de extinção molar ao c.d.o. 280 nm, $\varepsilon_{280 \text{ nm}} = 8693 \pm 175 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em 50 mM Tris-HCl, pH 7,6.

O conhecimento dos aminoácidos constituintes da proteína permite a determinação teórica do coeficiente de extinção molar, utilizando a ferramenta *ProtParam Tool (ExPASy)*, através da equação (4.1):

$$\varepsilon (\text{Prot}) = \text{Nr}(\text{Tir}) * \varepsilon (\text{Tir}) + \text{Nr}(\text{Trp}) * \varepsilon (\text{Trp}) + \text{Nr}(\text{Cistinas}) * \varepsilon (\text{Cistinas}) \quad (4.1)$$

(com, $\varepsilon (\text{Tir}) = 1490$, $\varepsilon (\text{Trp}) = 5500$ e $\varepsilon (\text{Cis}) = 125$, medidos em água)

Através da equação (4.1), obteve-se o coeficiente de extinção molar teórico: $\epsilon_{280\text{ nm}} = 8480\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Para a ORP, o coeficiente de extinção molar obtido depende unicamente dos aminoácidos tirosina e triptofano, uma vez que a proteína não possui qualquer resíduo de cisteína na sua sequência de aminoácidos. O coeficiente determinado apresenta um valor muito semelhante ao teórico determinado em água.

4.1.4. Sequência do N-terminal da ORP recombinante

De forma a confirmar se a proteína expressa é a ORP e se não ocorreu nenhum erro na grelha de leitura da ORF (*Open reading frame*) que possa ter conduzido a alterações na tradução, realizou-se a sequenciação dos aminoácidos do N-terminal através da degradação de Edman (secção 3.1.4. Materiais e métodos). Tendo-se obtido o seguinte resultado:

MIIAISASGQSPESGLDPRF

O alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína com o N-terminal obtido, representado na Figura 4.8, permitiu verificar que existe 100% de identidade nos aminoácidos sequenciados.

```

D.alaskensis G20 MIIAISASGQSPESGLDPRFGRAGFVLFNSETGQFSYKDNTQNLNAPQGAGIQAAMNVA 60
N-terminal      MIIAISASGQSPESGLDPRF----- 19
                *****

D.alaskensis G20 DAGASAVITGHVGPKAFAQALQQGNVAVYLTDSPTVHDALEAFRQGMLRPADQADKQGHW 119
N-terminal      -----

```

Figura 4.8. Alinhamento da sequência de aminoácidos da ORP com a sequência do N-terminal obtido pela degradação de Edman.

Este resultado permitiu a identificação inequívoca que a proteína expressa é a ORP e que não ocorreu nenhum erro na tradução.

4.1.5. Determinação da massa molecular

A massa molecular da ORP foi determinada por três metodologias: gel SDS-PAGE, espectrometria de massa Microtof ESI – TOF e filtração em gel. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Determinação da massa molecular da ORP por diferentes metodologias (SDS-PAGE, espectrometria de massa e filtração em gel).

Metodologia	Massa molecular (Da)
Gel SDS-PAGE	~12000
Microtof ESI – TOF	12443,78
Filtração em gel	~15000

O gel SDS-PAGE da ORP pura, Figura 4.6, mostrou a presença de uma banda com mobilidade correspondente a uma massa molecular de 12 kDa. A análise da proteína intacta por espectrometria de massa determinou uma massa molecular de $12443,78 \pm 0,089$ Da, similar à massa teórica calculada a partir da sequência de aminoácidos (12443,8 Da).

A filtração em gel permitiu calcular o valor de massa para a ORP a partir da curva de calibração, representada na Figura 4.9, obtida através da representação dos valores dos coeficientes de partição entre as fases cromatográficas (K_{av}) em função dos valores do logaritmo das massas moleculares das proteínas padrão (log MM), com a equação $K_{av} = -0,3557 (\log MM) + 1,8177$, $R^2 = 0,992$. A massa molecular da ORP determinada foi de 15 kDa, indicativo de que a proteína se encontra na forma monomérica, tal como reportado para a ORP nativa de *D.gigas* [36].

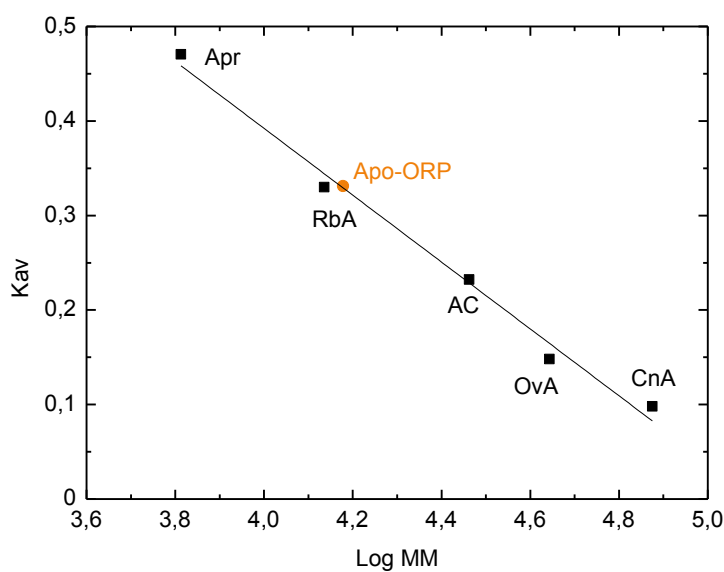


Figura 4.9. Recta de calibração, obtida a partir do kit comercial de calibração de filtração em gel *LMW* (Ge Healthcare) [91], com a equação, $K_{av} = -0,3557 (\log MM) + 1,8177$, $R^2 = 0,992$. As seguintes proteínas, representadas a cor preta, foram utilizadas na calibração: CnA - Conalbumina (75 kDa); OvA – Ovalbumina (43 kDa); AC – Anidrase carbônica (29kDa), RbA – Ribonuclease A (13,7 kDa) e Apr – Aprotinina (6,5 kDa). A apo ORP encontra-se representada com a cor laranja.

4.1.6. Reconstituição do centro metálico da ORP

Com o intuito de obter a ORP na sua forma holo e compreender o mecanismo de formação do seu centro metálico, procedeu-se à sua reconstituição, utilizando soluções de CuCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$, em condições aeróbias, à temperatura ambiente. O processo de reconstituição da apo-proteína foi monitorizado por espectroscopia UV-Vis. A proteína laranja foi incubada na presença de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ na razão 1ORP:2Cu:4Mo. O excesso de metais que não reagem ou que se ligam de forma adventícia à proteína, são separados por eluição da mistura numa coluna PD-10, seguida de eluição numa coluna Superdex 75 (ver secção 3.1.7. Materiais e métodos).

A proteína reconstituída foi caracterizada por espectroscopia UV-Vis. Esta técnica, permite observar as transições electrónicas entre os diversos níveis de energia, não só entre orbitais d (transições $d \rightarrow d$), mas também entre orbitais do ligando e do metal (LMCT) ou entre orbitais do metal e do ligando (MLCT) (denominadas transições de transferência de carga). As transições entre o ligando e o metal são muito frequentes e caracterizam-se pela presença de bandas de absorção de elevada intensidade no espectro, apresentando elevados coeficientes de extinção molar. Este tipo de transições, com carácter $S \rightarrow M$, foi identificado no espectro UV-Vis da ORP reconstituída, apresentado na Figura 4.10.

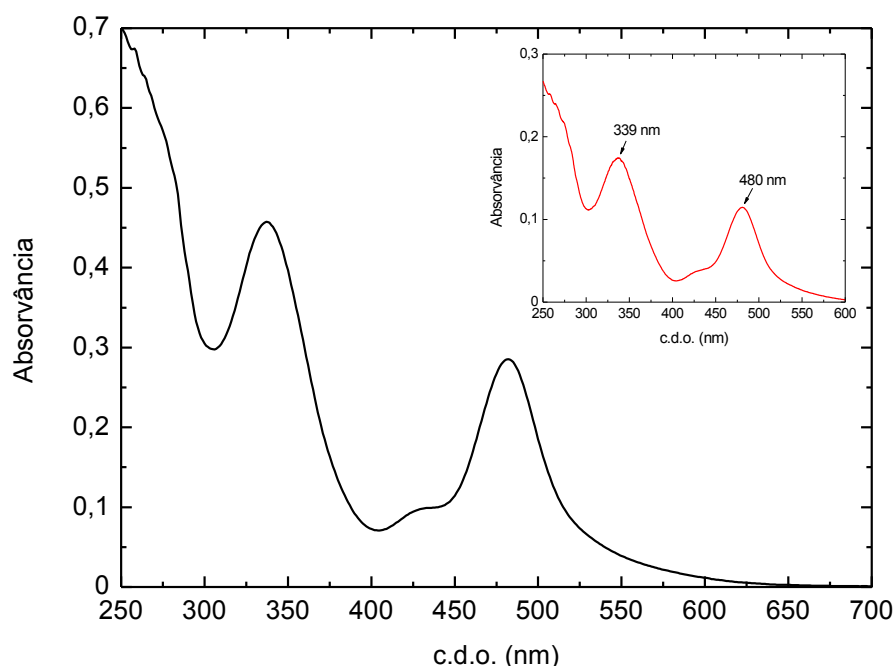


Figura 4.10. Espectro UV-Vis da proteína laranja reconstituída em 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,6 (representada a cor preta). *Insert:* espectro da ORP nativa de *D. alaskensis* G20 (representada a cor vermelha) em 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,6, reproduzido da referência [93].

O espectro do anião TTM apresenta bandas de transferência de carga de intensa absorção na região do visível a 316 e 465 nm. O espectro UV-Vis da ORP reconstituída apresenta dois máximos de absorvância aos c.d.o. 338 e 480 nm e um ombro a 430 nm, tal como previamente observados na ORP nativa de *D. gigas* e na ORP nativa de *D. alaskensis* [36][93]. Estas bandas são, segundo dados obtidos por EXAFS, características da presença de Mo⁺⁶ e Cu⁺¹ no centro metálico da proteína, possivelmente coordenados numa geometria tetraédrica [36]. Não é possível observar para as ORPs a banda característica de proteína a 280 nm uma vez que o TTM absorve na região do ultravioleta ao c.d.o. 242 nm [36]. As bandas aos c.d.o 480 e 338 são bandas de transferência de carga L→M, já identificadas no espectro do anião. Os valores de absorvância obtidos são idênticos à energia de transição S→Mo no anião tetratiomolibdato, mas afectadas pelo ambiente de coordenação em redor do anião [36], neste caso afectados pela coordenação do TTM ao cobre no ambiente proteico.

Na formação de complexos, muitas vezes pode observar-se um desvio ou divisão de uma ou mais bandas de transições electrónicas [36]. Contudo, devido à presença de fortes interacções M-L, o espectro na região das transições internas dos ligandos depende fortemente da natureza do átomo central, neste caso o molibdénio. Assim, as bandas de absorção observadas na ORP foram identificadas noutros complexos, como o Cu(II)/BSA/TTM que apresenta bandas a 338 e 482 nm em tampão KH₂PO₄, pH 8 [16].

Para avaliar a reconstituição da ORP calcularam-se as razões entre os máximos das bandas de absorção observadas nos espectros de UV-Vis das diferentes ORPs (Tabela 4.2):

Tabela 4.2. Razão das absorvâncias máximas obtidas para a ORP nativa de *D. gigas* e de *D. alaskensis* G20 e para a ORP recombinante de *D. alaskensis* G20 expressa em *E. coli*.

ORP	Abs _{338/277}	Abs _{480/277}	Abs _{480/338}	Ref.
Nativa <i>D. gigas</i>	-	-	0,535	[36]
Nativa <i>D. alaskensis</i> G20	0,84	0,55	0,66	[93]
Recombinante <i>D. alaskensis</i> G20	0,82	0,50	0,62	-

Os resultados apresentados revelam que a razão entre os máximos a 480 e 338 nm observados para as proteínas nativas e para a reconstituída são muito idênticos, o que é um indicativo da formação do mesmo tipo de centro. A proteína recombinante reconstituída apresenta razões de Abs_{338/277} e de Abs_{480/277} similares às obtidas para a proteína nativa de *D. alaskensis*, indicando que ambas as proteínas possuem uma percentagem de reconstituição idêntica.

A quantificação da proteína reconstituída foi realizada através do método do BCA, previamente descrito na secção 3.1.3. Materiais e métodos. Paralelamente foram preparadas

amostras para a quantificação do conteúdo total em cobre e em molibdénio através de ICP. A Tabela 4.3 resume os resultados obtidos:

Tabela 4.3. Quantificação da proteína total reconstituída, através do método BCA e dos metais molibdénio e cobre por ICP.

	Concentração (μM)
Proteína total	$50,6 \pm 0,44$
Mo	$37,8 \pm 3,5$
Cu	$16,5 \pm 1,0$

A análise dos metais realizada por emissão de plasma de acoplamento indutivo, indicou que a razão Mo:Cu da ORP reconstituída foi 2,3:1, o que está de acordo com os dados reportados de *D. gigas* que indicam que o Mo e o Cu são os únicos metais, detectados por ICP presentes na proteína e que a razão entre estes é 2Mo:1Cu [36].

As quantificações efectuadas permitiram inferir relativamente à eficácia da reconstituição. O conteúdo em Mo/proteína determinado foi 0,74, enquanto o conteúdo em Cu/proteína obtido foi 0,33. Estes resultados sugerem que só foi possível reconstituir aproximadamente 30 % da apo-proteína. O TTM além de ser muito reactivo, possui propriedades excepcionais como ligando na formação de complexos. A forte deslocalização de electrões nos complexos TMs, devido à presença de orbitais moleculares de baixa energia desocupadas, enfraquece as ligações MoS- π , resultando no aumento da densidade electrónica nos átomos de enxofre terminais, conduzindo à polimerização de heteroaniões [36]. A reconstituição parcial da proteína pode ser explicada por esta elevada reactividade do TTM e da sua facilidade em formar complexos poliméricos resultando, por vezes, na polimerização de heteroaniões e consequente indisponibilidade dos mesmos para a formação do centro metálico do tipo 2Mo:1Cu.

A concentração total de molibdénio e o espectro de absorção electrónica permitiram determinar o coeficiente de extinção molar aos comprimentos de onda 338 e 480 nm característicos da holo-proteína na região do visível por átomo de Mo. Os valores experimentais obtidos encontram-se apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Valores dos coeficientes de extinção molares experimentais das ORPs nativas de *D. gigas* e de *D. alaskensis* G20 e da ORP de *D. alaskensis* G20 recombinante.

Orp	$\epsilon_{338} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	$\epsilon_{480} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	Ref.
Nativa <i>D. gigas</i>	11000	5500	[36]
Nativa <i>D. alaskensis</i> G20	8500	5000	[93]
Recombinante <i>D. alaskensis</i> G20	10500 ± 900	6400 ± 600	-

Os coeficientes de extinção molar apresentados foram calculados com base no conteúdo total de molibdênio. Os coeficientes determinados para a proteína de *D. alaskensis* G20 expressa em *E.coli* e para a nativa foram realizados na presença de 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl a pH 7,6, enquanto para a espécie nativa de *D. gigas* foram determinados na presença de 50 mM Tris-HCl, 60 mM NaCl a pH 7,6. O coeficiente de extinção molar ao c.d.o. 338 nm é semelhante ao determinado para a ORP de *D. gigas* e ORP recombinante, sendo contudo ligeiramente inferior para a proteína nativa.

Para determinar se a reconstituição do centro metálico induz uma alteração na forma monomérica da proteína, foi utilizado um *kit* de calibração de filtração em gel (*GE Healthcare*) [91] para estimar a massa molecular da proteína reconstituída. O volume de eluição das diferentes proteínas com massas moleculares conhecidas, assim como a determinação do volume de exclusão da coluna permitiram a construção de uma curva de calibração, K_{av} em função do log MM, apresentada na Figura 4.11.

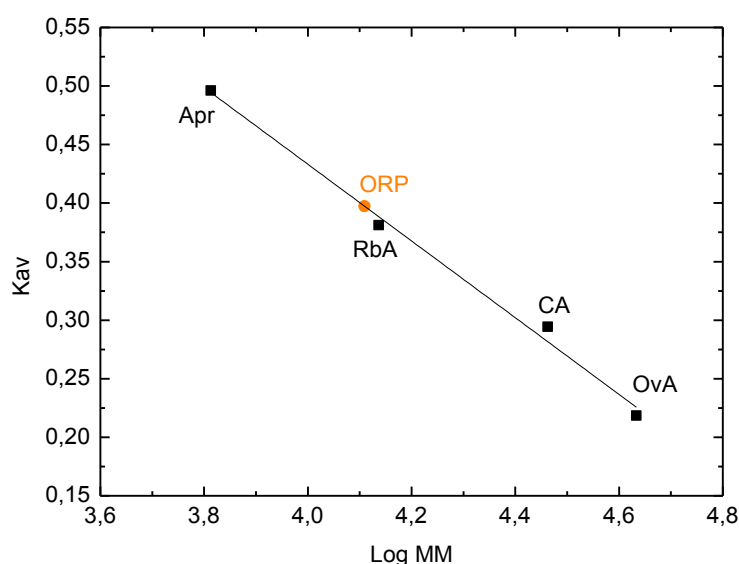


Figura 4.11. Curva de calibração de K_{av} em função do logMM com a equação, $K_{av} = -0,327(\log MM) + 1,744$, $R^2 = 0,991$. A curva foi construída com as proteínas padrão do kit comercial de calibração de filtração em gel *LMW* (*Ge Healthcare*) [91]. As seguintes proteínas, representadas a cor preta, foram utilizadas na calibração: OvA – Ovalbumina (43 kDa); AC – Anidrase carbônica (29kDa), RbA – Ribonuclease A (13,7 kDa) e Apr – Aprotinina (6,5 kDa). A ORP encontra-se representada com a cor laranja.

A massa molecular aparente da ORP foi estimada através do volume de eluição da proteína e da equação da recta ($K_{av} = -0,327(\log MM) + 1,744$, $R^2 = 0,991$). O valor estimado foi 13 kDa, o que indica que a proteína continua na forma monomérica após a reconstituição.

4.1.7. Formação do centro metálico da ORP

Com o objectivo de compreender os mecanismos de formação do centro metálico da proteína, realizaram-se, por espectroscopia UV-Vis, diferentes titulações de Mo e Cu na presença e ausência de proteína.

A apo-proteína foi incubada na presença de cloreto de cobre na razão 1ORP:1Cu e efectuaram-se adições sucessivas de tetratimolibdato de amónia à solução, de acordo com o procedimento descrito na secção 3.1.7. Materiais e métodos. Na Figura 4.12 é apresentado o perfil da titulação de UV-Vis das adições de molibdénio efectuadas.

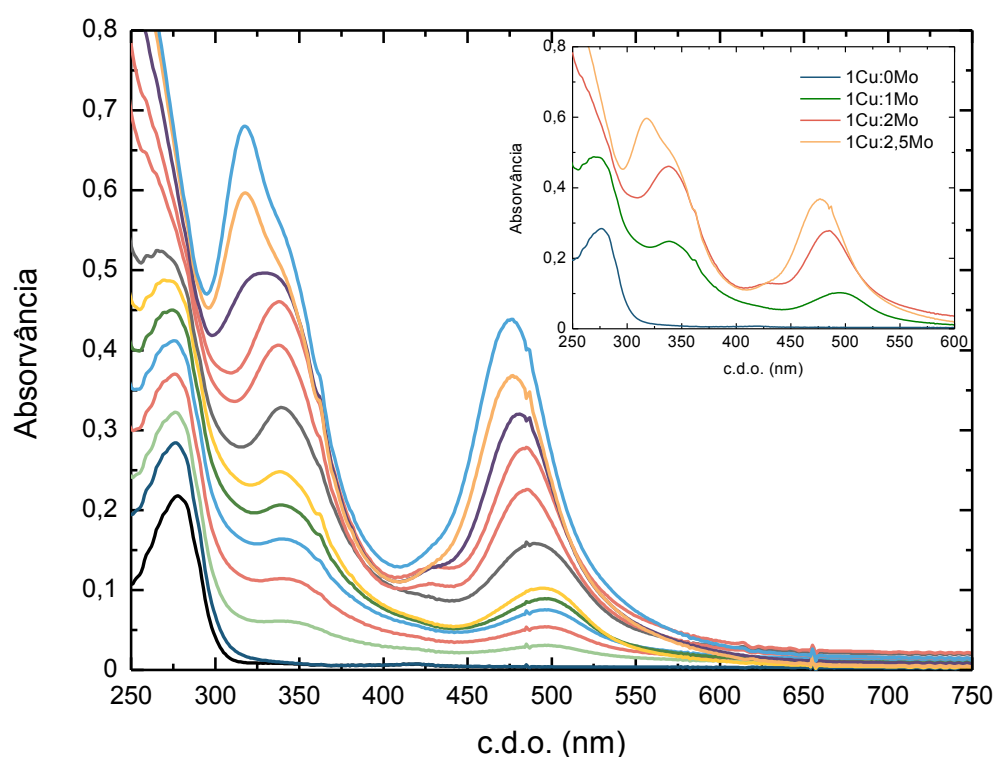


Figura 4.12. Titulação UV-Vis de 25 μ M de apo-proteína (representada com a cor preto) em 50 mM Tris-HCl, 20% DMF a pH 7,6, na presença de cloreto de cobre na razão 1:1 (representado a azul), utilizando o TTM como titulante. *Insert:* Espectros das adições de TTM em diferentes estequiometrias.

A análise do perfil de titulação mostra que a reacção dos metais na presença da proteína resulta na formação de dois máximos de absorção a 338 e 480 nm, observados previamente na ORP nativa de *D. gigas* e na ORP recombinante reconstituída de *D. alaskensis* G20. Com as sucessivas adições de molibdénio, surgem novos máximos de absorvância aos c.d.o. 317 e 465 nm, característicos da presença de TTM livre em solução.

Na Figura 4.13. encontra-se representada a absorvância a 338 nm, em função da razão Mo/Cu em solução. A concentração exacta das soluções de CuCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ foi determinada por ICP.

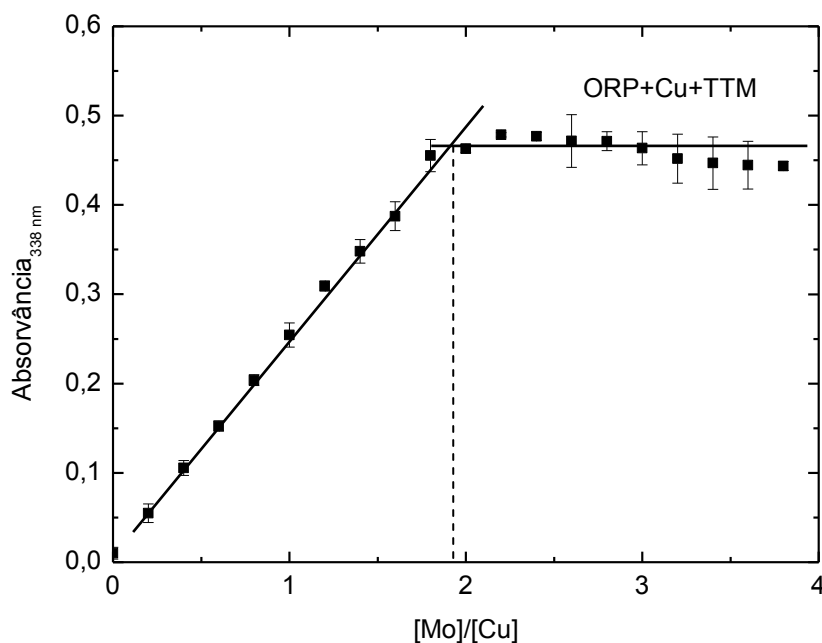


Figura 4.13. Perfil das absorvâncias corrigidas a 338 nm, da proteína incubada na presença de cobre, titulada com TTM. Os dados são apresentados com barras de erros que representam os desvios padrão baseados em 3 medições.

Os resultados obtidos permitem afirmar que a estequiometria dos metais na formação do centro metálico favorecida na presença da apo-ORP para o centro metálico formado é de 2Mo:1Cu.

A titulação do cobre com o molibdénio na ausência de ORP é fundamental para determinar a importância desta proteína na síntese do seu centro metálico uma vez que como se encontra amplamente descrito na literatura, o TTM e o cobre possuem a capacidade de reagir entre si para formar diferentes complexos [8][9]. A titulação do CuCl_2 com $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ na ausência da ORP é apresentado na Figura 4.14.

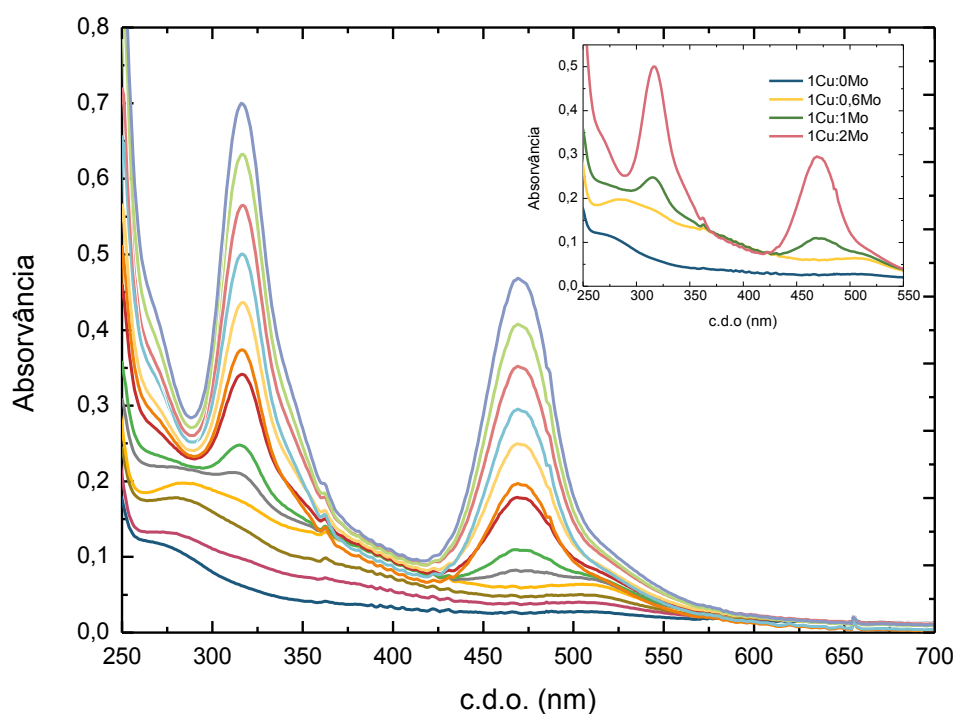


Figura 4.14. Titulação UV-Vis de 25 μ M de cloreto de cobre (identificado a azul escuro) com tetratiomolibdato de amônia em 50 mM Tris-HCl, 20% DMF a pH 7,6. *Insert:* Espectros das adições de TTM em diferentes estequiometrias.

Inicialmente na titulação (Figura 4.14) pode observar-se a formação de um ligeiro ombro a 510 nm, que se mantém até à estequiometria 1Cu:0,6Mo. Para estequiometrias superiores em Mo, são observados dois máximos de absorvância aos c.d.o. 316 e 465 nm, característicos da presença de tetratiomolibdato livre em solução. O aumento da absorvância destes máximos ocorre com as sucessivas adições de TTM a partir da estequiometria indicada. Estes resultados sugerem que todo o cobre presente em solução é rapidamente complexado com o TTM e adições subsequentes deste não alteram os compostos formados, apenas contribuem para o aumento da concentração de molibdénio livre em solução.

Esta titulação revela que na ausência da proteína não são identificados quaisquer máximos de absorção a 338 e 480 nm característicos das ORPs nativas de *D. gigas* e de *D. alaskensis* G20. As diferenças observadas entre as titulações dos metais na presença da ORP (Figura 4.12) e as titulações destes na ausência da proteína (Figura 4.14) sugerem que a ORP favorece a formação de um centro com uma estequiometria de 2Mo:1Cu, que não é formado na ausência de proteína, uma vez que é favorecida a estequiometria de 1Cu:0,6Mo.

Com o objectivo de estudar se a ordem dos titulantes influencia os resultados obtidos e tentar compreender em que circunstâncias se pode formar este centro *in vivo* titulou-se uma solução, contendo apo-proteína incubada com TTM na estequiometria 2Mo:1ORP com cloreto de cobre (II). O perfil de titulação obtido é apresentado na Figura 4.15.

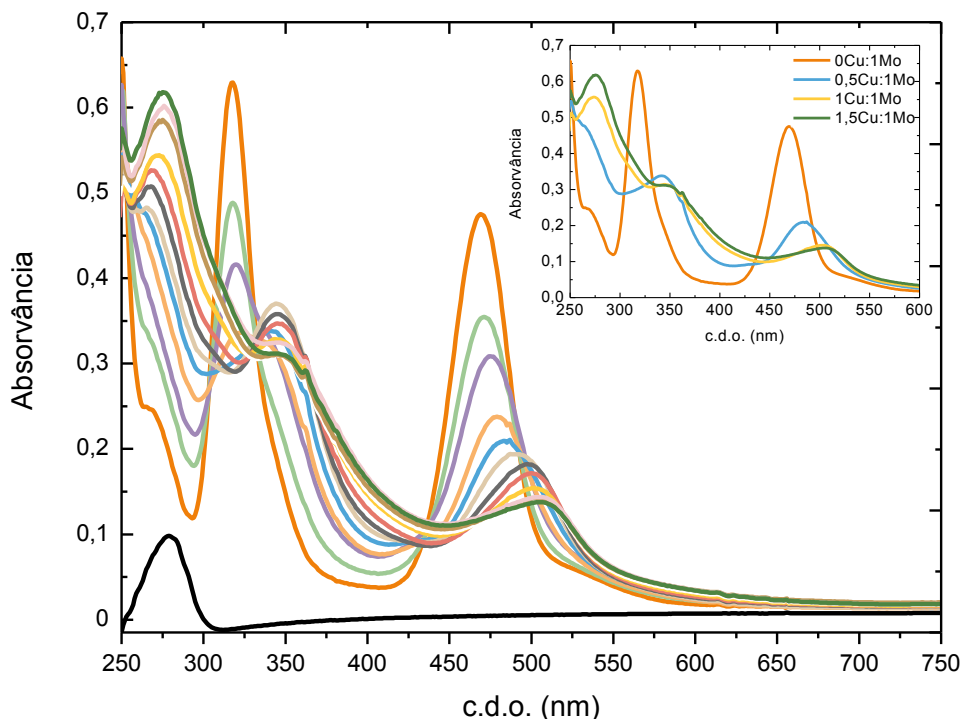


Figura 4.15. Titulação UV-Vis de 25 μ M da apo-proteína (identificado a preto) em 50 mM Tris-HCl, 20% DMF a pH 7,6, na presença de tetratimolibdato de amónio na razão 2:1 (identificado a laranja), utilizando cloreto de cobre (II) como titulante. *Insert:* Espectros das adições de CuCl_2 em diferentes estequiometrias.

Os resultados obtidos mostram que o cobre adicionado à solução promove o rápido decréscimo da intensidade das bandas UV-Vis características do tetratimolibdato livre até ao seu desaparecimento completo, dando origem a novos máximos de absorvância característicos do espectro da ORP (338 nm e a 480 nm, Figura 4.15 *Insert*), quando a estequiometria dos metais é de 1Mo:0,5Cu. À medida que a titulação segue para valores mais elevados de Cu estes máximos vão se deslocando para comprimentos de onda superiores estabilizando a aproximadamente 510 nm. O perfil da absorvância ao c.d.o. 338 nm, adquirido em cada adição de cobre efectuada é apresentado na Figura 4.16.

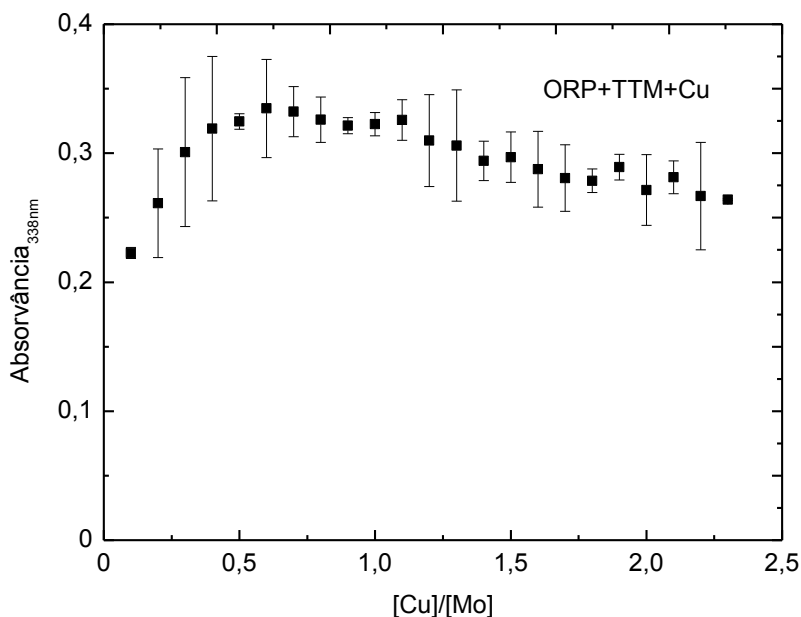


Figura 4.16. Perfil das absorvâncias a 338 nm, obtidas a partir da titulação da ORP incubada com TTM (2Mo:1ORP) e titulada com cloreto de cobre. Os dados são apresentados com barras de erros que representam os desvios padrão baseados em 3 medições.

A Figura 4.16 mostra que quando a estequiometria favorecida pela proteína é atingida (2Mo:1Cu), atinge-se a absorvância máxima a 338 nm na titulação. Continuando a titular com Cu observa-se um ligeiro decréscimo da absorvância a este comprimento de onda. Isto significa que parte do centro da ORP começa a transformar-se num novo complexo com uma nova estequiometria. Este resultado obtido permite questionar se haverá a possibilidade de se observar a formação de novos centros Mo-Cu em interacção na proteína.

4.2. Análise do Operão ORP de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Tal como descrito anteriormente (secção 1.6. Introdução), no operão *D. vulgaris* Hildenborough, os genes *DVU2103*, *DVU2104* (ATPases) e *DVU2108* (ORP) encontram-se em unidades transcricionais distintas (*ORP1* e *ORP2*) mas sob o controlo do mesmo regulador, sendo a sua transcrição activada simultaneamente.

A identificação de domínios conservados através da análise de COGs (*Clusters of Orthologous groups of proteins*) do NCBI para as proteínas DVU2103 e DVU2104 revelou a presença, em ambas as proteínas, de um domínio pertencente ao COG1149, identificado como a

superfamília *Min-D P-loop ATPases* contendo centros ferro-enxofre semelhantes aos encontrados em ferredoxinas. A utilização do programa PROsite permitiu a identificação de dois domínios 4Fe-4S em ambas as proteínas, os quais se encontram apresentados na Figura 4.17 e assinalados a cor cinzenta.

```

DVU2103      MKQFVVISGKGGTGKTSVTAGLAA---VGKDMVLADCDVDAADLHLVLAPEIRERHDFI 56
DVU2104      -MNIIVASGKGGTGKTTVAVNLAASYAMQGLPVTLVDCDVEEPNAHLFVDARWQVR-SLC 58
              ::.* *****:*.:.***      *  :.*.*****: .: **.: .: * .:

DVU2103      SGVVASIEPEACI--SCGLCTTHCRYGAIPQG-YAPQVAPEHCEGCGVCAHVCPTGAARL 113
DVU2104      GVPVPAIDPDRCLGESCRRCVEACRFKALAMLGGELLVFAELCHGCGLCCLVCPAGVVGT 118
              .  *.:*.:*.: *.: ** *.: **.: *.:      *  . * . * . * . * . * .

DVU2103      SDRRCGEWYV-----SDTRFGPMVHAALGIGEENSGLKLVSTVTRARELAEARDA-- 163
DVU2104      ASRPVGEVRQGVASCHVHGETCHMAFRDGVLRVGEAMATPLIKAVKRTAEDANATSHAGY 178
              :.*  **              :.* . .: .*. *.:** :  *.:*.: *.: :  . *

DVU2103      SVVLIDGSPGVGCPVIASLAGADAALAVTEPTVSALHDLERVHALARHFDVRMAVLLNKA 223
DVU2104      GVTLWDCPPGTACATINALDEADFVVLVAESTAFGLHDLRLAVGLVCHLGLPHGIVINRF 238
              .*. * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .

DVU2103      DIHPGMAERIIGYCTTHDLPLVGRFGFSPLFVQAQLEGRTLPEQDSGEWRQRFNGVWNQL 283
DVU2104      GMGD---DRVATWAASEGIDVLGRLPFS-LEAASRNAGGGLLDASHDLAAYRDLGARL 294
              .:      :*: .:.....: :*: ** * . : : *  * : * : . :.: :*:

DVU2103      LALV--- 287
DVU2104      LEKGIRS 301
              *

```

Figura 4.17. Alinhamento da sequência da proteína DVU2103 com a sequência de DVU2104 de *D. vulgaris* Hildenborough. As sequências foram obtidas através da interface *Blastp* e o alinhamento foi realizado na plataforma *clustalW2*. As sequências a cinzento identificam os domínios [4Fe-4S] obtidos pelo PROsite.

Através do programa SMART foi possível identificar também um domínio CbiA associado com as enzimas ácido cobirínico a,c-diamida sintase, as quais participam na biossíntese da vitamina B12. Este programa permitiu também identificar na proteína DVU2104 outro domínio conservado, entre os aminoácidos 1 e 79, denominado *MipZ*. A proteína *MipZ*, identificada na *Caulobacter crescentus*, coordena e regula a formação e posição do anel FtsZ durante a divisão celular [94].

Para a proteína hipotética DVU2105 não foi possível identificar nenhum domínio conhecido utilizando os programas referidos anteriormente. No regulador, DVU2106, foram identificados domínios de interacção com o factor σ^{54} , e de ligação ao DNA (relacionados com a transcrição e mecanismos de transdução de sinal), um domínio ATPase tipo-AAA e um multi-domínio do tipo PAS (sensores que detectam diferentes estímulos químicos e físicos tais como o oxigénio).

Na proteína DVU2108 (ORP), utilizando a ferramenta CDD do NCBI, foi identificado um domínio do tipo MTH1175 que faz parte do COG1143. O domínio identificado é conservado na proteína laranja de *D. gigas*. Esta família de proteínas está relacionada com proteínas envolvidas

na fixação de azoto, tais como as proteínas NifX e NifB. Estas proteínas estão envolvidas na biossíntese do centro FeMo-co, funcionando como precursores na construção e inserção do cofactor na dinitrogenase. A proteína hipotética DVU2107 apresenta um domínio conservado MTH1175, semelhante ao observado para a ORP, no entanto a análise com o COGNITOR, disponível no NCBI, não a relacionou com nenhum COG.

Na proteína DVU2109 foi identificado um multi-domínio, do tipo multi resistência e adaptação ao pH (MRP), e um domínio de ligação ao ATP no N-terminal. Foram identificados, também, um domínio do tipo MTH1175, parte da família do COG 1433 e um domínio do tipo ParA/MinD ATPase. A análise pelo COGNITOR relaciona esta proteína com o COG0489, ATPases envolvidas na divisão celular. A Tabela 4.5. resume os domínios identificados em cada ORF.

Tabela 4.5. Domínios identificados nas sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes do operão da ORP.

Proteínas	Domínio	COG
DVU2103	CobQ/CobB/MinD/ParA, ATPase/ contendo centro Fe-S	1149
DVU2104	CobQ/CobB/MinD/ParA, MipZ, ATPase/ contendo centro Fe-S	1149
DVU2105	-	-
DVU2106	Interacção σ^{54} , PAS, ATPase tipo-AAA, ligação ao DNA	2204
DVU2107	MTH1175	-
DVU2108	MTH1175	1143
DVU2109	MRP, MTH1175, MinD/ParA	0489

As massas moleculares e o pIs das proteínas constituintes do operão ORP foram determinados utilizando a ferramenta *ProtParam* (EXPASY). Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Massa molecular e pI das proteínas codificadas pelos genes do operão da ORP em *D. vulgaris* Hildenborough, obtidas através do programa *ProtParam* (EXPASY).

Proteína	Número de a.a	Massa molecular (kDa)	pI
DVU2103	295	31,55	6,15
DVU2104	301	31,41	5,55
DVU2105	170	16,75	11,6
DVU2106	458	50,59	6,40
DVU2107	183	20,06	9,23
DVU2108	119	12,45	5,71
DVU2109	487	49,96	5,44

4.2.1. Expressão homóloga das ATPases de *D. Vulgaris* Hildenborough

As ATPases, DVU2103 e DVU2104, são conservadas em microorganismos anaeróbios, mas a sua função permanece desconhecida. Para isolar estas proteínas procedeu-se à sua expressão heteróloga em *E.coli* (dados não publicados). No entanto estas foram sempre expressas em corpos de inclusão, apesar de terem sido testados diferentes vectores e condições de expressão.

Como forma de solucionar este problema e com o objectivo de obter as duas ATPases na forma solúvel, foi realizada a expressão homóloga destas ATPases em *D. vulgaris* Hildenborough, em colaboração com o grupo da Prof. Corinne Aubert do CNRS em Marselha. Os genes DVU2103, DVU2104 e DVU2105, que compreendem a unidade transcricional *ORP1* de *D. vulgaris*, foram clonados no vector de expressão pBMC6 (secção 3.2.2. Materiais e métodos). À proteína DVU2103 foi adicionada uma cauda de histidinas (*His-tag*) visando facilitar o processo de purificação. O vector de expressão foi transformado em células de *D. vulgaris* Hildenborough.

Para avaliar o comportamento da cultura de *D. vulgaris* Hildenborough contendo o plasmídeo de expressão realizou-se uma curva de crescimento onde foi monitorizada a D.O._{600nm} durante 60 h, a 33 °C, em frascos anaeróbios de 2 L. Na figura 4.18 encontra-se representada a curva de crescimento obtida.

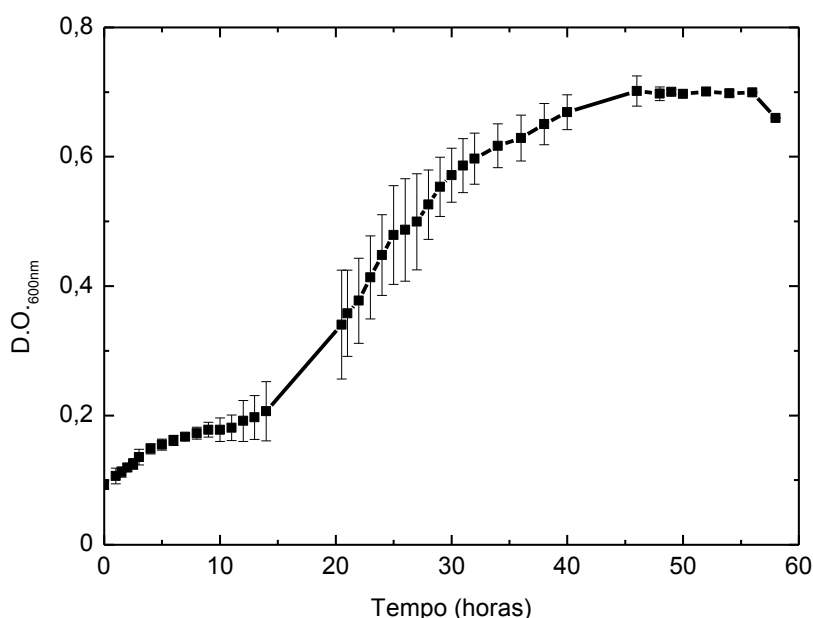


Figura 4.18. Curva de crescimento de *D. vulgaris* Hildenborough em meio *Postgate C*, durante 60 h.

A análise da Figura 4.18 possibilita a identificação de quatro fases de crescimento distintas. Nas primeiras 10 h é identificada a fase *lag* seguindo-se a fase exponencial. Após 35 horas do início do crescimento pode observar-se que as células já se encontram em fase

estacionária e ao fim de 58 h é observada a redução significativa da concentração celular indicando o início da fase de morte. Para a obtenção das proteínas cujos genes foram clonados no vector de expressão pretende-se recolher as células no fim da fase exponencial, de forma a obter uma elevada massa celular sem que as células tenham ainda atingido a fase estacionária. A curva de crescimento realizada permitiu-nos identificar o tempo de crescimento/ densidade óptica (~ 30 h, $D.O_{600nm} \sim 0,6$) para a recolha das células no final da fase exponencial de crescimento.

Após a recolha e lise celular, a produção das proteínas na fase solúvel foi avaliada em gel SDS-PAGE 12,5% em acrilamida, o qual se encontra apresentado na Figura 4.19. Neste gel é possível observar uma banda na fracção solúvel a 32 kDa (poço2) que deve corresponder às duas ATPases, DVU2103 e DVU2104, de acordo com as massas teóricas obtidas através do *ProtParam (ExPASy)* (Tabela 4.6). Estas proteínas são indistinguíveis por electroforesse SDS-PAGE uma vez que a diferença nas suas massas moleculares é de apenas 1 kDa. É de salientar que também nas fracções correspondentes aos restos celulares e fracção membranar é possível observar uma banda com massa molecular equivalente.

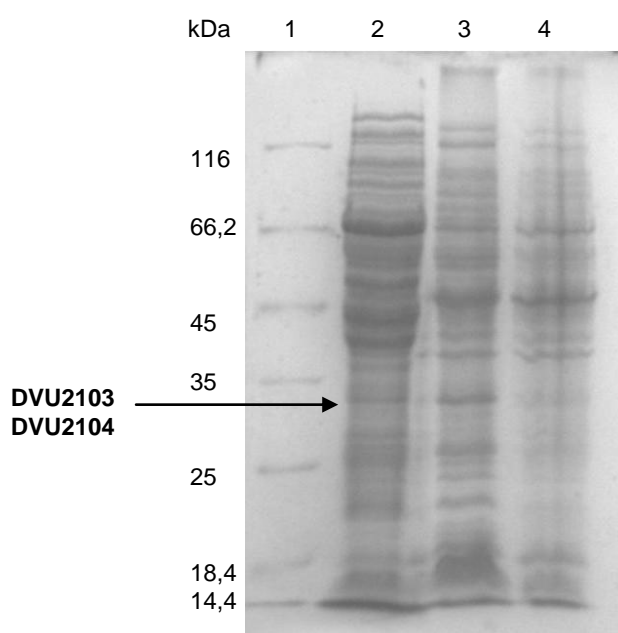


Figura 4.19. Perfil de expressão das proteínas DVU2103, DVU2104, e DVU2105 por SDS-PAGE. 1. marcador de massas moleculares; 2. fracção solúvel depois da expressão em células de *D.vulgaris* Hildenborough; 3. restos celulares; 4. fracção membranar.

O gene DVU2105 também clonado no vector de expressão e que codifica para uma proteína com massa molecular esperada de 16,8 kDa, não é detectado na fracção solúvel. Este resultado pode ser indicativo de que a proteína está a ser produzida em pequena quantidade, não detectável pelo método utilizado, ou de que foi produzida e sofreu um processo de degradação. Uma hipótese alternativa é a desta proteína se encontrar em corpos de inclusão ou na fracção membranar. Com efeito é possível observar na fracção correspondente aos restos

celulares (poço 3) uma banda intensa a uma massa molecular semelhante à da proteína DVU2105.

4.2.2. Purificação das ATPases em aerobiose

O primeiro passo de purificação consistiu numa cromatografia de afinidade IMAC (*Immobilized metal ion affinity chromatography*). Nesta etapa de purificação a proteína DVU2103, sobreexpressa com uma cauda de histidinas, interage especificamente com a matriz possibilitando a sua purificação. Simultaneamente as outras proteínas que tenham uma interacção específica com esta ATPase podem também ser co-purificadas. A eluição da proteína foi efectuada utilizando como ligando de competição o imidazole, e a fracção obtida apresentava uma coloração castanha, sugerindo a presença de centros do tipo [Fe-S], já prevista anteriormente através da análise dos domínios das proteínas DVU2103 e DVU2104.

A fracção foi analisada através de gel SDS-PAGE 12,5% em acrilamida (Figura 4.20) de forma a permitir identificar a presença das proteínas em estudo.

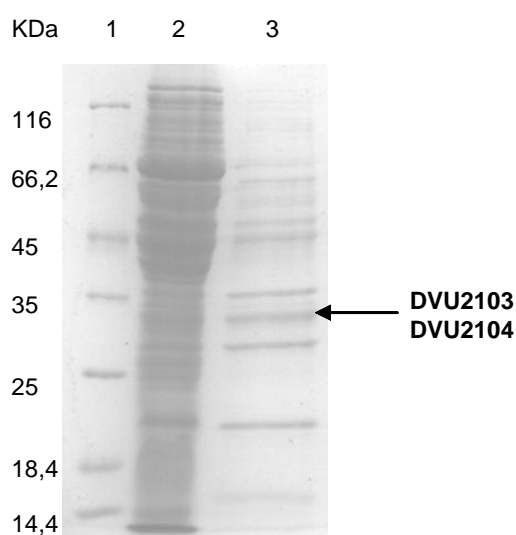


Figura 4.20. Gel SDS-PAGE após purificação por cromatografia de afinidade (IMAC). 1. marcador de massas moleculares; 2. fracção solúvel após expressão em *D. vulgaris* Hildenborough; 3. fracção após cromatografia de afinidade.

O perfil de purificação observado (poço 3) mostra a presença de uma banda a uma massa molecular correspondente à das ATPases, e a co-eluição de outras proteínas. Cerca de 2 h após esta etapa de purificação observou-se que a fracção eluída perdeu a coloração castanha inicial. Esta observação sugere que possivelmente os centros [Fe-S], das proteínas em solução, provavelmente as ATPases, são sensíveis à presença de oxigénio. De facto, e de acordo com a sua origem, os centros [Fe-S] são geralmente susceptíveis à presença do oxigénio, excepto quando estão no interior da proteína [95].

4.2.3. Purificação e caracterização das ATPases em anaerobiose

Para preservar os potenciais centros [Fe-S] destas proteínas foi adoptada uma nova estratégia de purificação em condições anaeróbias.

Na purificação por cromatografia de afinidade foi efectuada uma eluição em duas etapas, isto é, utilizando duas concentrações diferentes de imidazole (ver secção 3.2.3. Materiais e métodos), por forma a minimizar a presença de contaminantes na amostra que possam interagir inespecificamente com a matriz da coluna. A fracção proteica obtida após eluição com 500 mM de imidazole foi analisada por gel SDS-PAGE 12,5% em acrilamida (Figura 4.21A). Tal como já tinha sido observado anteriormente (secção 4.2.2. Resultados e discussão), após este passo de purificação são observadas no gel várias bandas. As massas moleculares correspondentes a estas bandas foram comparadas com as esperadas para as proteínas codificadas pelo operão ORP. Esta análise permitiu relacionar a banda A, com menor massa molecular (~12 kDa) com a proteína ORP e a banda C (~32 kDa) com as ATPases, DVU2103 e DVU2104, com massas moleculares teóricas de 31,5 kDa e 31,4 kDa, respectivamente. A banda observada a 50 kDa poderá estar relacionada com a MRP (DVU2109). A fracção proteica foi também analisada por electroforese em gel PAGE em condições não desnaturantes (gel nativo) (Figura 4.21B). Os resultados obtidos mostram a presença de duas bandas intensas, uma delas com reduzida mobilidade electroforética, indiciando elevada razão carga/massa. Comparando este resultado com o obtido em condições desnaturantes (Figura 4.21A), verifica-se que a maioria das proteínas eluídas nesta etapa de purificação agrega formando complexos proteicos.

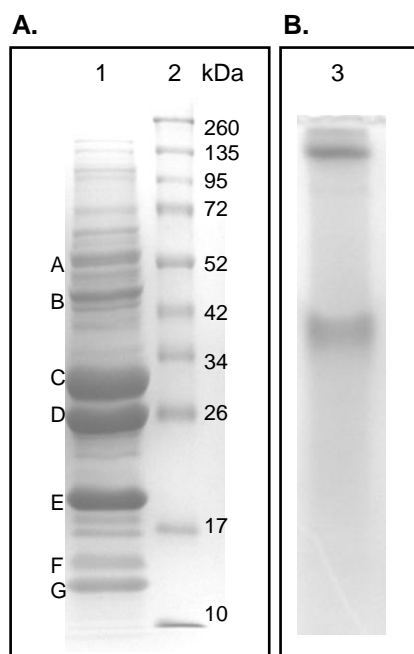


Figura 4.21. Géis de poliacrilamida obtidos após purificação anaeróbia por cromatografia de afinidade. **A.** Gel SDS-PAGE: 1. Após *His-Trap*; 2. Marcador de massas moleculares. As proteínas identificadas por espectrometria de massa estão indicadas pelas letras (A-G). **B.** Gel PAGE: 3. Após *His-Trap*.

Após esta etapa de purificação e mantendo a fracção proteica em anaerobiose observou-se que a sua coloração castanha se mantém inalterada, indicando que atmosfera inerte é fundamental na preservação dos hipotéticos centros [Fe-S].

Para validar as atribuições efectuadas procedeu-se à identificação das bandas de proteína mais intensas (A, B, C, D, E, F, G) por *peptide mass fingerprint* num espectrómetro de massa Maldi-TOF-MS. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Identificação das proteínas co-eluídas com a proteína DVU2103-His-tag utilizando o *MASCOT search engine*. As amostras (A-G) estão indicadas no gel SDS-PAGE (Figura 4.21A).

Amostra	Nome da proteína	Base de dados	Score	Coverage (%)	Péptidos
Mistura de proteínas					
A	(metiltransferase, L-aspartato oxidase)	NCBI	165	-	-
B	Sulfato adenililtransferase	NCBI	150	48	22
C	ATPase (DVU2103)	NCBI	96	43	9
D	HYP DVU0949	NCBI	106	42	10
E	Rubreritina	NCBI/ Swiss Prot	165/ 162	55	14
F	Regulador transcricional da família fur	NCBI	92	75	12
G	HYP DVU2108	NCBI	83	51	6

Esta técnica permitiu a identificação de duas proteínas do operão da ORP, a DVU2103 que contém a *tag* de histidinas (banda C) e a DVU2108 (banda G), correspondente à ORP. Estudos de *pulldown* endógeno reportados na literatura, em que foram inseridas strep-tags nas proteínas DVU2103, DVU2108 e DVU2109 e realizada a sua imobilização numa resina Strep-Tactin, permitiram a posterior identificação dos parceiros fisiológicos por espectrometria de massa [46]. Os resultados obtidos forneceram a primeira indicação experimental que as proteínas DVU2103, DVU2104, DVU2105, DVU2108 e DVU2109 interagem *in vivo* formando um complexo multiproteico com significado fisiológico. O facto de no presente trabalho de mestrado, se ter observado que as proteínas DVU2103 e DVU2108 co-eluíram, após a purificação utilizando a His-trap, permite corroborar a hipótese destas proteínas constituírem parceiros fisiológicos envolvidos na formação de um complexo. No entanto, relativamente às proteínas DVU2104 e DVU2105, que estavam também clonadas no vector de expressão construído não foi possível identificar as bandas correspondentes às suas massas moleculares após este primeiro passo de purificação. Este resultado poderá ser explicado pelo facto destas proteínas se encontrarem sob a forma de corpos de inclusão. De facto, através da análise do gel de

expressão (secção 4.2.1. Resultados e discussão, Figura 4.19) é possível observar, nos restos celulares, bandas com massas moleculares correspondentes a estas proteínas. No entanto, para comprovar esta hipótese seria necessário proceder à identificação das proteínas correspondentes a estas bandas por espectrometria de massa o que não foi realizado no âmbito deste trabalho.

A análise efectuada permitiu também identificar proteínas expressas que foram co-eluídas nesta etapa de purificação, tais como a rubreritina, a proteína hipotética DVU0949, a sulfato metiltransferase e a L-aspartato oxidase. No entanto, não é possível inferir se todas estas proteínas são co-eluídas porque estabelecem uma interacção não específica com a matriz ou se interagem, com significado fisiológico, com o complexo proteico formado pelas proteínas do operão da ORP. A rubreritina, em bactérias redutoras de sulfato, é uma proteína contendo Fe não hémico composta por dois domínios distintos, um domínio de ligação ao Fe do tipo *diiron*, na região N-terminal, e um domínio semelhante à rubredoxina na região C-terminal [96]. Esta proteína funciona como uma peroxidase em organismos anaeróbios. Estudos proteómicos revelaram que a produção da rubreritina se encontra aumentada em condições de stress oxidativo [97][98]. O facto da rubreritina ser uma das proteínas co-eluídas levanta a questão do operão da ORP poder ser um sistema activado em resposta a stress oxidativo, uma vez que o regulador da transcrição deste operão, a proteína DVU2106, possui domínios PAS que estão muitas vezes associados a respostas a este tipo de stress.

O espectro UV-Vis da fracção obtida após esta etapa de purificação encontra-se apresentado na Figura 4.22.

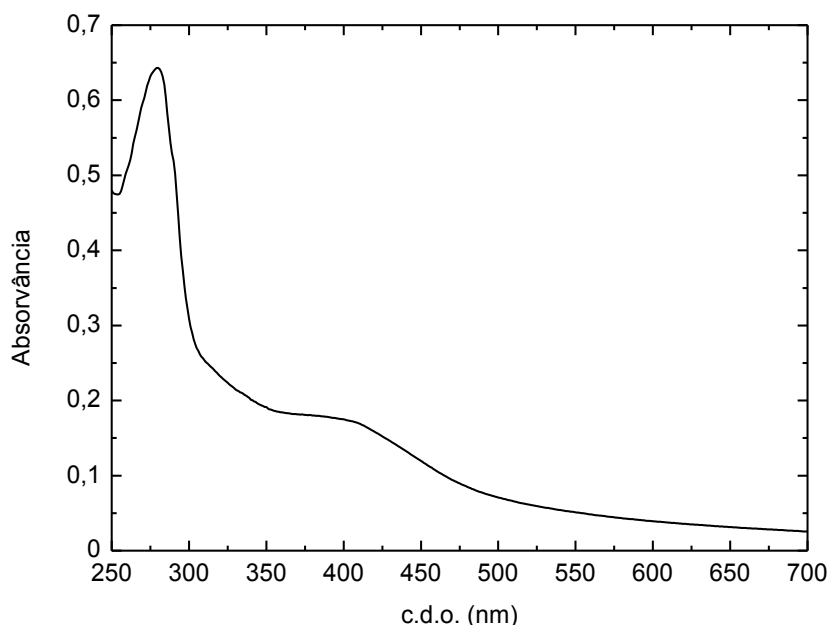


Figura 4.22. Espectro UV-Vis da fracção das ATPases em Tris-HCl 20 mM pH 7,6 obtido após purificação por cromatografia de afinidade.

O espectro UV-Vis revela a presença de uma banda de absorção na região do visível a 400 nm e uma razão A_{400}/A_{277} de 0,274. A banda alargada a 400 nm é característica de bandas de transferência de carga Fe-S e são observadas nas proteínas contendo este tipo de centros [99] [100].

Na tentativa de isolar a ATPase DVU2103, foi necessário recorrer a um segundo passo de purificação. A fracção recolhida na etapa anterior foi aplicada numa coluna de permuta aniónica (*Resource Q*) e a eluição das proteínas foi efectuada através de um gradiente descontinuo, tal como descrito na secção 3.2.3. Materiais e métodos. Na Figura 4.23, é apresentado o gel SDS-PAGE das proteínas eluídas em cada etapa do gradiente.

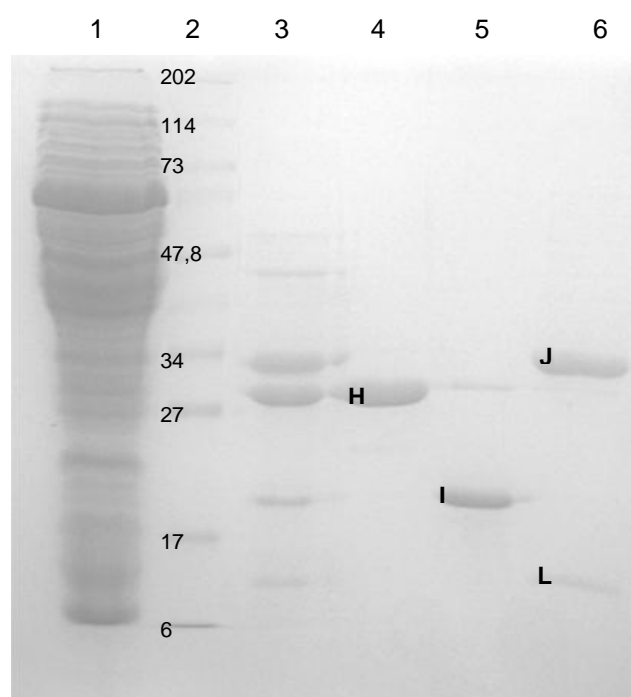


Figura 4.23. Gel SDS-PAGE após purificação por cromatografia aniónica: 1. Fracção solúvel; 2. Marcador de massas moleculares (kDa); 3. Após *His Trap*; 4. Após *Resource Q* (eluição com 20 mM Tris-HCl pH 7,6); 5. Após *Resource Q* (eluição com 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl pH 7,6); 6. Após *Resource Q* (eluição com 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl pH 7,6). Os produtos dos genes identificados por espectrometria de massa são indicados pelas letras (H-L).

Os resultados apresentados na Figura 4.23 (comparar o perfil proteico do poço 3, fracção após His-trap com o dos poços 4, 5 e 6, fracções colectadas após troca aniónica) mostram que este tipo de cromatografia é eficaz na separação das proteínas co-eluídas na etapa anterior. Para confirmar a identificação das proteínas obtida no passo anterior, procedeu-se novamente à análise das proteínas correspondentes às bandas assinaladas no gel com as letras H, I, J, L, por Maldi-TOF-MS (*peptide mass fingerprint analysis*). Os resultados das identificações encontram-se na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Identificação por Maldi-Tof-MS das proteínas eluídas na etapa de purificação com a *Resource Q*. Para a identificação foi realizada a pesquisa no *MASCOT search engine*.

Nr.	Nome da proteína	Base de dados	Score	Coverage (%)	Péptidos
H	HYP DVU0949	NCBI	86	46	12
I	Rubreritina	NCBI/ Swiss Prot	198/ 194	60/59	14
J	ATPase (DVU2103)	NCBI	92	51	12
L	HYP DVU2108	NCBI	81	51	6

A identificação das proteínas, confirmou a presença da rubreritina (banda I) no poço 5, da ATPase DVU2103 (banda J) e da DVU2108-ORP (banda L de fraca intensidade) no poço 6, e uma proteína hipotética DVU0949 (banda H) no poço 4. Esta proteína possui um domínio relacionado com o transporte de Co^{2+} . Embora não seja possível com o trabalho realizado nesta tese, determinar se existe uma interação específica entre esta proteína e as proteínas do operão da ORP é curioso evidenciar que a ATPase DVU2103 possui um domínio CbiA, que como foi descrito anteriormente está presente em proteínas envolvidas na biossíntese da vitamina B12 que contêm um ião cobalto [101]. Foi possível obter a ATPase DVU2103 com elevado grau de pureza, embora tal como foi referido anteriormente seja possível observar a presença da ORP.

O espectro de UV-Vis da ATPase DVU2103 (Figura 4.24), possui uma banda intensa alargada a 400 nm, característica da presença na proteína de centros Fe-S. A razão de pureza, A_{400}/A_{277} é 0,5144. Este resultado, comparativamente à razão calculada após a primeira etapa de purificação ($A_{400}/A_{277} = 0,274$), indica que a proteína é obtida, neste segundo passo de purificação, com maior grau de pureza e permite associar o espectro UV-Vis obtido para esta ATPase com o característico de proteínas contendo centros do tipo Fe-S.

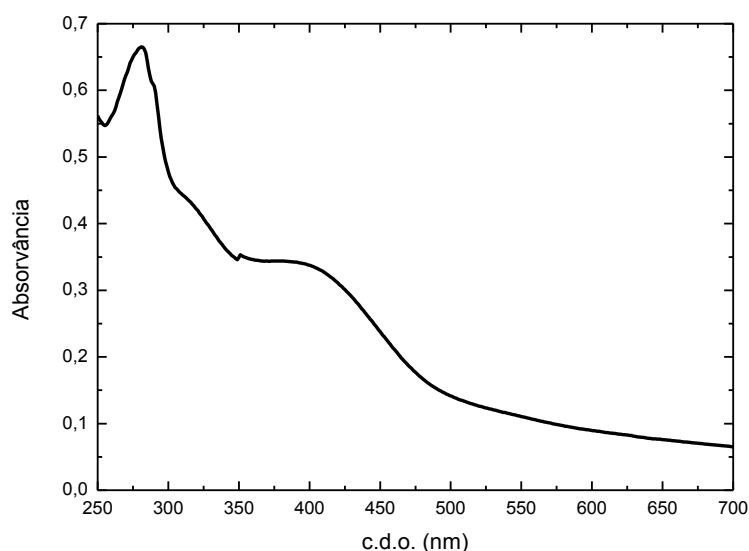


Figura 4.24. Espectro UV-Vis da ATPase DVU2103 em Tris-HCl 20 mM pH 7,6 após o último passo de purificação.

O coeficiente de extinção molar determinado ao c.d.o de 400 nm para a DVU2103, foi $\epsilon_{400\text{ nm}} = 32600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Considerando que o coeficiente de extinção molar típico reportado na literatura por átomo de Fe neste tipo de centros é de aproximadamente $4000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [100], pode concluir-se que a DVU2103 deverá conter 2 centros do tipo [4Fe-4S] ($2 \times [4\text{Fe-4S}]$), tal como indicado pela análise de domínios realizada previamente, e ainda que esta se encontra provavelmente completamente reconstituída, isto é na forma de holo-proteína.

De facto, verifica-se que a sequência de aminoácidos da proteína (Figura. 4.25) apresenta vários resíduos cisteicos que fazem parte de sequências típicas envolvidas na coordenação a este tipo de centros [Fe-S]. A sua análise, sugere que o motivo de ligação que envolve as cisteínas Cys76 Cys79 Cys82 Cys114 deverá estar a coordenar um dos centros [4Fe-4S], e que o motivo contendo as cisteínas Cys86 Cys104 Cys107 Cys110 deverá participar na coordenação do outro centro [4Fe-4S].

```

MHHHHHHHHK QFVVISGKGG TGKTSVTAGL AAVGKDMVLA DCDVDAADLH LVLAPEIRER 60
HDFISGVVAS IEPEACISCG LCTTHCRYGA IPQGYAPQVA PEHCEGCGVC AHVPTGAAR 120
LSDRRCGEWY VSDTRFGPMV HAALGIGEEN SGKLVSTVRT RARELAEARD ASVVLIDGSP 180
GVGCPVIASL AGADAALAVT EPTVSALHDL ERVHALARHF DVRMAVLLNK ADIHPGMAER 240
IIGYCTTHDL PLVGRFGFSP LFVQAQLEGR TLPEQDSGEW RQRFNGVWNQ LLALV 290

```

Figura 4.10. Sequência de aminoácidos da proteína DVU2103. A verde são identificados os resíduos de cisteínas envolvidos na ligação do centro metálico.

É ainda importante referir, que com base na concentração de proteína determinada no final da purificação e do volume total de proteína obtido foi possível determinar um valor aproximado para o rendimento da expressão de $\sim 50\text{ }\mu\text{g/L}$ de cultura. Apesar deste sistema de expressão solucionar o problema da insolubilidade da proteína quando esta é expressa em *E.coli*, o rendimento de proteína por litro de cultura é muito reduzido. Para se obter proteína em quantidade suficiente para efectuar a caracterização espectroscópica por EPR dos centros [Fe-S], bem como realizar estudos electroquímicos para a determinação do potencial destes metalocentros é necessário um crescimento em grande escala.

5. Considerações finais e perspectivas futuras

Neste trabalho, a ORP de *D. alaskensis* G20 foi expressa heterologicamente em *E.coli*, na forma de apo-proteína com um rendimento de 11 mg/ L de cultura.

Foi possível neste trabalho reconstituir o centro metálico da ORP incubando a proteína com TTM e cloreto de cobre na proporção 2Mo:1Cu. A proteína reconstituída apresenta máximos de absorvância a 338 nm e 480 nm, tal como se observou na proteína nativa. Determinaram-se os coeficientes de extinção molar por átomo de Mo para estes c.d.o., $\epsilon_{338} = 10500 \pm 900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{480} = 6400 \pm 600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Com o objectivo de compreender os mecanismos de formação do centro metálico foram realizadas titulações de UV-Vis da apo-proteína incubada com CuCl_2 , utilizando como titulante o TTM e titulou-se o CuCl_2 com o TTM na ausência da proteína. Os estudos efectuados permitiram concluir que a presença da ORP induz a formação do centro metálico com a estequiometria 2Mo:1Cu. Na ausência de proteína os dois metais reagem entre si favorecendo uma estequiometria de 1Cu:0,6 Mo.

Um dos aspectos importantes que merece ser pesquisado num futuro próximo é se a reconstituição provoca alterações estruturais na proteína. Este aspecto pode ser averiguado através de estudos comparativos de RMN ou cristalografia de raios-X entre a apo-proteína e a holo. A estrutura por raios-X da holo-proteína permitiria também identificar inequivocamente a localização do centro metálico na proteína.

Apesar do reconhecimento de que os genes *DVU2103*, *DVU2104*, *DVU2105*, *DVU2108* e *DVU2109* presentes na operação da ORP, formam provavelmente um complexo importante para a divisão celular, o mecanismo específico que envolve este complexo para o posicionamento do septo de divisão permanece desconhecido. Para confirmar a formação do complexo e

compreender o seu mecanismo é fundamental estudar as proteínas envolvidas na sua formação. Neste trabalho procedeu-se à expressão homóloga dos genes que codificam para as duas ATPases e para a proteína hipotética DVU2105. No entanto só foi possível identificar na fracção solúvel a ATPase DVU2103. As condições de expressão para a DVU2104 e DVU2105 necessitam de ser optimizadas.

A identificação por espectrometria de massa de diversas proteínas co-eluídas após a purificação por cromatografia de afinidade sugerem a possibilidade de formação de um complexo com significado fisiológico.

A ATPase DVU2103 constitui a primeira proteína purificada do operão da ORP. Através da análise bioinformática foi possível prever a existência de dois centros [4Fe-4S]. Esta previsão foi corroborada pela caracterização espectroscópica de UV-Vis que apresentou uma banda característica das proteínas contendo este tipo de centro. O coeficiente de extinção molar determinado, $\epsilon_{400\text{ nm}} = 32600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, apresentou um valor típico para uma proteína contendo 2 centros [4Fe-4S]. A caracterização espectroscópica por EPR, bem como por electroquímica permitirá futuramente caracterizar as propriedades dos centros metálicos identificados. Estes centros mostraram ser extremamente sensíveis ao oxigénio o que obriga a que todo o procedimento de purificação e caracterização seja efectuado em condições de anaerobiose. Estudos cinéticos para averiguar a função de ATPase destas proteínas necessitam ser realizados para complementar a sua caracterização.

Numa perspectiva geral o trabalho desenvolvido neste mestrado constitui o primeiro passo para a caracterização das proteínas codificadas pelo operão da ORP, visando a compreensão futura do papel destas proteínas na divisão celular dos organismos anaeróbios.

6. Bibliografia

- [1] As. Sigel, H. Sigel, Eds., *Metal ions in biological systems - molybdenum and tungsten: their role in biological process*. New York: Marcel Dekker, 2002.
- [2] R. Hille, "Molybdenum and tungsten in biology," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 27, no. 7, pp. 360–367, Jul. 2002.
- [3] G. Muyzer, A. J. M. Stams, "The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 6, no. 6, pp. 441–54, Jun. 2008.
- [4] S. R. Emerson, S. S. Husted, "Ocean anoxia and the concentrations of molybdenum and vanadium in seawater," *Mar. Chem.*, vol. 34, pp. 177–196, 1991.
- [5] C. D. & V. Helz, G.R., Miller, C.V., Charnock, J.M., Mosselmans, J.F.W., Pattrick, R.A.D., Garner, D.J., "Mechanisms of molybdenum removal from the sea and its concentration in black shales: EXAFS evidence," *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 60, pp. 3631–3642, 1996.
- [6] I. Bertini, Gray, Stiefel, and Valentine, *Biological Inorganic chemistry: Structure and Reactivity*. University Science Books, 2007.
- [7] M. P. Coughlan, *Molybdenum and Molybdenum-Containing Enzymes*. Oxford: Pergamon Press, 1980, pp. 119–185.
- [8] A. Müller, E. Diemann, R. Jostes, H. Bögge, "Transition Metal Thiometalates: Properties and Significance in Complex and Bioinorganic Chemistry," *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 20, no. 11, pp. 934–955, Nov. 1981.
- [9] S. H. Laurie, "Thiomolybdates — Simple but Very Versatile Reagents," *European Journal of Inorganic Chemistry*, vol. 2000, no. 12, pp. 2443–2450, 2000.
- [10] J. Mellor, *A comprehensive treatise on inorganic and theoretical chemistry*. Wiley, 1922, p. 1490.
- [11] M. A. Harmer, A. G. Sykes, "Kinetics of the interconversion of sulfido and oxomolybdate (VI) species $\text{MoO}_x\text{S}_{4-x}^{2-}$ in aqueous solution," *Inorg. Chem.*, vol. 19, pp. 2881–2885, 1980.
- [12] B. E. Erickson, G. R. Helz, "Molybdenum (VI) speciation in sulfidic waters - Stability and lability of thiomolibdates," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 64, pp. 1149–1158, 2000.
- [13] J. C. Dabrowiak, *Metals in Medicine*. John Wiley & Sons, 2009, p. 340.
- [14] B. K. Shin, J. Han, "Structure and Physical Properties of Copper Thiomolybdate Complex, $(\text{nBu}_4\text{N})_3[\text{MoS}_4\text{Cu}_3\text{Cl}_4]$," *ChemInform*, vol. 40, no. 6, p. no–no, 2009.

- [15] W. S. Ferguson, "The teart pastures of Somerset. IV. The effect of continuous administration of copper sulphate to dairy cows," *The Journal of Agricultural Science*, vol. 33, no. 02, p. 116, Mar. 2009.
- [16] E. K. Quagraine, R. S. Reid, "UV/visible spectrophotometric studies of the interactions of thiomolybdates, copper(II) and other ligands.," *Journal of inorganic biochemistry*, vol. 85, no. 1, pp. 53–60, May 2001.
- [17] H. M. Alvarez, Y. Xue, C. D. Robinson, M. A. Canalizo-Hernández, R. G. Marvin, R. A. Kelly, A. Mondragón, J. E. Penner-Hahn, T. V. O'Halloran, "Tetrathiomolybdate Inhibits Copper Trafficking Proteins Through Metal Cluster Formation," *Science*, vol. 327, no. 5963, pp. 331–334, Jan. 2010.
- [18] P. C. Bull, G. R. Thomas, J. M. Rommens, J. R. Forbes, D. W. Cox, "The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene.," *Nature genetics*, vol. 5, no. 4, pp. 327–37, Dec. 1993.
- [19] G. N. George, I. J. Pickering, H. H. Harris, J. Gailer, D. Klein, J. Lichtmannegger, K.-H. Summer, "Tetrathiomolybdate causes formation of hepatic copper-molybdenum clusters in an animal model of Wilson's disease.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, no. 7, pp. 1704–5, Feb. 2003.
- [20] L. Zhang, J. Lichtmannegger, K. H. Summer, S. Webb, I. J. Pickering, G. N. George, "Tracing copper-thiomolybdate complexes in a prospective treatment for Wilson's disease.," *Biochemistry*, vol. 48, no. 5, pp. 891–7, Feb. 2009.
- [21] G. J. Brewer, R. D. Dick, V. Yuzbasiyan-Gurkin, R. Tankanow, a. B. Young, K. J. Kluin, "Initial Therapy of Patients With Wilson's Disease With Tetrathiomolybdate," *Archives of Neurology*, vol. 48, no. 1, pp. 42–47, Jan. 1991.
- [22] G. J. Brewer, R. D. Dick, D. K. Grover, V. LeClaire, M. Tseng, M. Wicha, K. Pienta, B. G. Redman, T. Jahan, V. K. Sondak, M. Strawderman, G. LeCarpentier, S. D. Merajver, "Treatment of Metastatic Cancer with Tetrathiomolybdate, an Anticopper, Antiangiogenic Agent: Phase I Study," *Clinical Cancer Research*, vol. 6, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2000.
- [23] G. J. Brewer, "The use of copper-lowering therapy with tetrathiomolybdate in medicine," *Expert opinion on investigational drugs*, vol. 18, no. 1, pp. 89–97, Jan. 2009.
- [24] Q. Pan, C. G. Kleer, K. L. V. Golen, J. Irani, K. M. Bottema, C. Bias, M. D. Carvalho, E. A. Mesri, D. M. Robins, R. D. Dick, G. J. Brewer, S. D. Merajver, "Advances in Brief Copper Deficiency Induced by Tetrathiomolybdate Suppresses Tumor Growth," pp. 4854–4859, 2002.
- [25] G. Schwarz, R. R. Mendel, M. W. Ribbe, "Molybdenum cofactors, enzymes and pathways.," *Nature*, vol. 460, no. 7257, pp. 839–47, Aug. 2009.
- [26] C. D. Brondino, Ä. A. G. Rivas, M. J. Roma, Ä. J. G. Moura, I. Moura, "Structural and Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Studies of Mononuclear Molybdenum Enzymes from Sulfate-Reducing Bacteria Mononuclear Molybdenum Enzymes :," *Accounts of Chemical Research*, vol. 39, no. 10, pp. 788–796, 2006.
- [27] B. K. Burgess D. J. Lowe, "Mechanism of molybdenum nitrogenase," *Chem. Rev.*, vol. 96, pp. 2983–3012, 1996.
- [28] P. Atkins, T. Overton, *Shriver & Atkins' Inorganic Chemistry*. Oxford University Press, 2009, p. 864.

- [29] R. Hille, "Molybdenum-containing hydroxylases.," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 433, no. 1, pp. 107–16, Jan. 2005.
- [30] R. A. Rothery, G. J. Workun, J. H. Weiner, "The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1778, pp. 1897–1929, 2008.
- [31] R. Hille, "The Mononuclear Molybdenum Enzymes †," *Chemical Reviews*, vol. 96, no. 7, pp. 2757–2816, Jan. 1996.
- [32] M. J. Romão, J. Knäblein, R. Huber, J. J. Moura, "Structure and function of molybdopterin containing enzymes," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 68, no. 2–3, pp. 121–144, 1997.
- [33] Pau, R.N. Lawson, D.M., "Metal Ions in Biological Systems", vol. 39. CRC Press, 2002, pp. 31–74.
- [34] D. Fenske, M. Gnida, K. Schneider, W. Meyer Klauke, J. Schemberg, V. Henschel, A. Meyer, A. Knöchel, A. Müller, "A New Type of Metalloprotein: The Mo Storage Protein from *Azotobacter vinelandii* Contains a Polynuclear Molybdenum–Oxide Cluster," *ChemBioChem*, vol. 6, no. 2, pp. 405–413, Feb. 2005.
- [35] G. N. George, I. J. Pickering, E. Y. Yu, R. C. Prince, S. a. Bursakov, O. Y. Gavel, I. Moura, J. J. G. Moura, "A Novel Protein-Bound Copper–Molybdenum Cluster," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 122, no. 34, pp. 8321–8322, Aug. 2000.
- [36] S. a Bursakov, O. Y. Gavel, G. Di Rocco, J. Lampreia, J. Calvete, a S. Pereira, J. J. G. Moura, I. Moura, "Antagonists Mo and Cu in a heterometallic cluster present on a novel protein (orange protein) isolated from *Desulfovibrio gigas*," *Journal of inorganic biochemistry*, vol. 98, no. 5, pp. 833–40, May 2004.
- [37] S. R. Pauleta, A. G. Duarte, M. S. Carepo, A. S. Pereira, P. Tavares, I. Moura, J. J. G. Moura, "NMR assignment of the apo-form of a *Desulfovibrio gigas* protein containing a novel Mo-Cu cluster.," *Biomolecular NMR assignments*, vol. 1, no. 1, pp. 81–3, Jul. 2007.
- [38] S. H. Laurie, D. E. Pratt, J. B. Raynor, "The copper-molybdenum antagonism in ruminants. III: Reaction of copper (II) with tetrathiomolybdate (VI)," *Inorganica chimica acta*, vol. 123, no. 4, pp. 193–196.
- [39] B. K. Maiti, T. Avilés, M. Matzapetakis, I. Moura, S. R. Pauleta, and J. J. G. Moura, "Synthesis of $[\text{MoS}_4]^{2-}\text{M}$ (M = Cu and Cd) Clusters: Potential NMR Spectroscopic Structural Probes for the Orange Protein," *European Journal of Inorganic Chemistry*, p. n/a–n/a, Aug. 2012.
- [40] S. Najmudin, C. Bonifácio, A. G. Duarte, S. R. Pauleta, S. R. Pualeta, I. Moura, J. J. G. Moura, M. J. Romão, "Crystallization and crystallographic analysis of the apo form of the orange protein (ORP) from *Desulfovibrio gigas*," *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, vol. 65, no. Pt 7, pp. 730–2, Jul. 2009.
- [41] B. K. Maiti, K. Pal, S. Sarkar, "A structural model of mixed metal sulfide cluster of molybdenum and copper present in the orange protein of *Desulfovibrio gigas*," *Inorganic Chemistry Communications*, vol. 7, no. 9, pp. 1027–1029, Sep. 2004.
- [42] T. A. Hansen, "Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes," vol. 66, no. 1, pp. 165–185, 1994.

- [43] W. A. Hamilton, "Microbially Influenced Corrosion as a Model System for the Study of Metal Microbe Interactions: A Unifying Electron Transfer Hypothesis," *Biofouling*, vol. 19, no. 1, pp. 65–76, 2003.
- [44] J. F. Heidelberg, R. Seshadri, S. a Haveman, C. L. Hemme, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, J. a Eisen, N. Ward, B. Methe, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, R. J. Dodson, a S. Durkin, R. Madupu, W. C. Nelson, S. a Sullivan, D. Fouts, D. H. Haft, J. Selengut, J. D. Peterson, T. M. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, D. Radune, G. Dimitrov, M. Hance, K. Tran, H. Khouri, J. Gill, T. R. Utterback, T. V. Feldblyum, J. D. Wall, G. Voordouw, C. M. Fraser, "The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough," *Nature biotechnology*, vol. 22, no. 5, pp. 554–9, May 2004.
- [45] D. A. Elias, A. Mukhopadhyay, M. P. Joachimiak, E. C. Drury, A. M. Redding, H.-C. B. Yen, M. W. Fields, T. C. Hazen, A. P. Arkin, J. D. Keasling, J. D. Wall, "Expression profiling of hypothetical genes in *Desulfovibrio vulgaris* leads to improved functional annotation," *Nucleic acids research*, vol. 37, no. 9, pp. 2926–39, May 2009.
- [46] A. Fiévet, L. My, E. Cascales, S. R. Pauleta, I. Moura, Z. Dermoun, C. S. Bernard, A. Dolla, C. Aubert, M. Ansaldi, "The Anaerobe-Specific Orange Protein Complex of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough Is Encoded by Two Divergent Operons Coregulated by σ 54 and a Cognate Transcriptional Regulator The Anaerobe-Specific Orange Protein Complex of *Desulfovibrio vulgaris* Hil," *Society*, 2011.
- [47] Z. Dermoun, A. Foulon, M. D. Miller, D. J. Harrington, A. M. Deacon, C. Sebban-Kreuzer, P. Roche, D. Lafitte, O. Bornet, I. A. Wilson, A. Dolla, "TM0486 from the Hyperthermophilic Anaerobe *Thermotoga maritima* is a Thiamin-binding Protein Involved in Response of the Cell to Oxidative Conditions," *Journal of Molecular Biology*, vol. 400, no. 3, pp. 463–476, Jul. 2010.
- [48] R. L. Tatusov, M. Y. Galperin, D. a Natale, E. V. Koonin, "The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution," *Nucleic acids research*, vol. 28, no. 1, pp. 33–6, Jan. 2000.
- [49] R. L. Tatusov, E. V. Koonin, D. J. Lipman, "A Genomic Perspective on Protein Families," *Science*, vol. 278, no. 5338, pp. 631–637, Oct. 1997.
- [50] J. C. Scholten, D. E. Culley, F. J. Brockman, G. Wu, W. Zhang, "Evolution of the syntrophic interaction between *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: Involvement of an ancient horizontal gene transfer," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 352, no. 1, pp. 48–54, Jan. 2007.
- [51] V. Fresquet, L. Williams, F. M. Raushel, "Mechanism of Cobyirinic Acid a, c-Diamide Synthetase from *Salmonella*," pp. 10619–10627, 2004.
- [52] H. Beinert, P. Kiley, "Redox control of gene expression involving iron-sulfur proteins. Change of oxidation-state or assembly/disassembly of Fe-S clusters?," *FEBS letters*, vol. 382, no. 1–2, pp. 218–9; discussion 220–1, Mar. 1996.
- [53] M. Buck, M.-T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo, J. D. Gralla, "The Bacterial Enhancer-Dependent σ 54 (ζ N) Transcription Factor," *Journal of Bacteriology*, vol. 182, no. 15, pp. 4129–4136, Aug. 2000.
- [54] D. Bose, T. Pape, P. C. Burrows, M. Rappas, S. R. Wigneshweraraj, M. Buck, X. Zhang, "Organization of an activator-bound RNA polymerase holoenzyme," *Molecular cell*, vol. 32, no. 3, pp. 337–46, Nov. 2008.
- [55] A. Möglichen, R. A. Ayers, K. Moffat, "Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains," *Structure*, vol. 17, no. 10, pp. 1282–1294, Oct. 2009.

- [56] S. Herrmann, Q. Ma, M. S. Johnson, A. V. Repik, B. L. Taylor, "PAS Domain of the Aer Redox Sensor Requires C-Terminal Residues for Native-Fold Formation and Flavin Adenine Dinucleotide Binding," *Journal of Bacteriology*, vol. 186, no. 20, pp. 6782–6791, Oct. 2004.
- [57] J. Lutkenhaus, "Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring," *Annual review of biochemistry*, vol. 76, pp. 539–62, Jan. 2007.
- [58] L. Rothfield, A. Taghbalout, Y.-L. Shih, "Spatial control of bacterial division-site placement," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 3, no. 12, pp. 959–68, Dec. 2005.
- [59] D. S. Weiss, "Bacterial cell division the septal ring," *Molecular microbiology*, vol. 54, no. 3, pp. 588–97, Nov. 2004.
- [60] J. Lutkenhaus S. G. Addinall, "Bacterial Cell Division," pp. 93–116, 1997.
- [61] C. L. Vischer, "Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model," *Res Microbiol*, vol. 142, no. 2–3, p. 309, Jan. 1991.
- [62] P. A. J. de Boer, R. E. Crossley, L. I. Rothfield, "A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*," *Cell*, vol. 56, no. 4, pp. 641–649, Feb. 1989.
- [63] T. G. Bernhardt, P. A. J. de Boer, "SlmA, a Nucleoid-Associated, FtsZ Binding Protein Required for Blocking Septal Ring Assembly over Chromosomes in *E. coli*," *Molecular Cell*, vol. 18, no. 5, pp. 555–564, May 2005.
- [64] Z. Hu, J. Lutkenhaus, "Topological Regulation of Cell Division in *E. coli*: Spatiotemporal Oscillation of MinD Requires Stimulation of Its ATPase by MinE and Phospholipid," *Molecular Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 1337–1343, Jun. 2001.
- [65] D. M. Raskin, P. A. J. de Boer, "Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 9, pp. 4971–4976, Apr. 1999.
- [66] Z. Hu, J. Lutkenhaus, "A conserved sequence at the C-terminus of MinD is required for binding to the membrane and targeting MinC to the septum," *Molecular Microbiology*, vol. 47, no. 2, pp. 345–355, 2003.
- [67] M. Loose, K. Kruse, P. Schwille, "Protein self-organization: lessons from the min system," *Annual review of biophysics*, vol. 40, pp. 315–36, Jan. 2011.
- [68] N. M. Proteins, E. I. Stiefel, G. N. George, "Ferredoxins, Hydrogenases, and Nitrogenases: Metal-Sulfide Proteins," *Proteins*.
- [69] T. Glaser, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, "Ligand K-edge X-ray absorption spectroscopy: a direct probe of ligand-metal covalency," *Accounts of chemical research*, vol. 33, no. 12, pp. 859–868, Dec. 2000.
- [70] D. C. Johnson, D. R. Dean, A. D. Smith, M. K. Johnson, "Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 74, pp. 247–281, 2005.
- [71] H. Beinert, "Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises," *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 5, no. 1, pp. 2–15, Feb. 2000.

- [72] K. Brzóska, S. Męczyńska, M. Kruszewski, "Iron-sulfur cluster proteins : electron transfer and beyond *," *Review Literature And Arts Of The Americas*, vol. 53, no. 4, pp. 685–691, 2006.
- [73] H. Sticht, P. Ro, "The structure of iron \pm sulfur proteins," *Molecular Biology*, vol. 70, pp. 95–136, 1998.
- [74] S. Bian, J. A. Cowan, "Protein-bound iron – sulfur centers. Form, function, and assembly," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 192, pp. 1049–1066, 1999.
- [75] G. Strahs, J. Kraut, "Low-resolution electron-density and anomalous-scattering-density maps of Chromatium high-potential iron protein.,", *Journal of molecular biology*, vol. 35, no. 3, pp. 503–512, Aug. 1968.
- [76] K. K. Surerus, M. C. Kennedy, H. Beinert, E. Münck, "Mössbauer study of the inactive Fe₃S₄ and Fe₃Se₄ and the active Fe₄Se₄ forms of beef heart aconitase.,", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 24, pp. 9846–9850, Dec. 1989.
- [77] A. Volbeda, M. H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, "Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*.,", *Nature*, vol. 373, no. 6515, pp. 580–7, Feb. 1995.
- [78] J. W. Peters, W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon, L. C. Seefeldt, "X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 282, no. 5395, pp. 1853–1858, Dec. 1998.
- [79] L. Liu, T. Nogi, M. Kobayashi, T. Nozawa, K. Miki, "Ultrahigh-resolution structure of high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 58, no. Pt 7, pp. 1085–1091, Jul. 2002.
- [80] D. Aragão, S. Macedo, E. P. Mitchell, C. V. Romão, M. Y. Liu, C. Frazão, L. M. Saraiva, A. V. Xavier, J. LeGall, W. M. A. M. van Dongen, W. R. Hagen, M. Teixeira, M. A. Carrondo, P. Lindley, "Reduced hybrid cluster proteins (HCP) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 and *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough): X-ray structures at high resolution using synchrotron radiation.,", *Journal of biological inorganic chemistry*, vol. 8, no. 5, pp. 540–8, May 2003.
- [81] B. J. Lemon, J. W. Peters, "Iron-only hydrogenases," *Online*, pp. 1–14, 2006.
- [82] D. Dobritzsch, G. Schneider, K. D. Schnackerz, Y. Lindqvist, "Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil.,", *The EMBO journal*, vol. 20, no. 4, pp. 650–60, Feb. 2001.
- [83] M. Lee, T. Gräwert, F. Qwitterer, F. Rohdich, J. Eppinger, W. Eisenreich, A. Bacher, M. Groll, "Biosynthesis of isoprenoids: crystal structure of the [4Fe-4S] cluster protein IspG.,", *Journal of molecular biology*, vol. 404, no. 4, pp. 600–10, Dec. 2010.
- [84] J. Meyer, "Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution," *Journal of biological inorganic chemistry*, vol. 13, no. 2, pp. 157–70, Feb. 2008.
- [85] E. T. Adman, L. C. Sieker, L. H. Jensen, "Structure of a bacterial ferredoxin," *The Journal of biological chemistry*, vol. 248, no. 11, pp. 3987–3996, Jun. 1973.
- [86] D. H. Flint, R. M. Allen, "Iron-Sulfur Proteins with Nonredox Functions," *ChemInform*, vol. 28, no. 10, pp. 2315–2334, Aug. 2010.

- [87] L. J. Hauser, M. L. Land, S. D. Brown, F. Larimer, K. L. Keller, B. J. Rapp-Giles, M. N. Price, M. Lin, D. C. Bruce, J. C. Detter, R. Tapia, C. S. Han, L. a Goodwin, J.-F. Cheng, S. Pitluck, A. Copeland, S. Lucas, M. Nolan, A. L. Lapidus, A. V. Palumbo, J. D. Wall, "Complete genome sequence and updated annotation of *Desulfovibrio alaskensis* G20.," *Journal of bacteriology*, vol. 193, no. 16, pp. 4268–9, Aug. 2011.
- [88] "NZYTech, BL21(DE3) Competent Cells NZYTech, Ed. (Genes e enzymes, Lisboa, 2011)."
- [89] U. K. LAEMMLI, "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, Aug. 1970.
- [90] "Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit - Product Code: BCA1 AND B 9643, Sigma."
- [91] "Gel Filtration LMW Calibration Kit Handbook - Cat. 28-4038-41. 2008, GE Healthcare's."
- [92] J. R. Postgate, "Versatile Medium for the Enumeration of Sulfate-Reducing Bacteria," *Applied Microbiology*, vol. 11, no. 3, pp. 265–267, May 1963.
- [93] M. S. P. Carepo, *unpublished results*.
- [94] M. Thanbichler, L. Shapiro, "MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*," *Cell*, vol. 126, no. 1, pp. 147–62, Jul. 2006.
- [95] A. Marquet, B. T. S. Bui, A. G. Smith, M. J. Warren, "Iron-sulfur proteins as initiators of radical chemistry," *Natural product reports*, vol. 24, no. 5, pp. 1027–40, Oct. 2007.
- [96] F. deMaré, D. M. J. Kurtz, P. Nordlund, "The structure of *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin reveals a unique combination of rubredoxin-like FeS₄ and ferritin-like diiron domains," *Nature structural biology*, vol. 3, no. 6, pp. 539–546, Jun. 1996.
- [97] W. Zhang, D. E. Culley, M. Hogan, L. Vitiritti, F. J. Brockman, "Oxidative stress and heat-shock responses in *Desulfovibrio vulgaris* by genome-wide transcriptomic analysis," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 90, no. 1, pp. 41–55, Jul. 2006.
- [98] M. Fournier, C. Aubert, Z. Dermoun, M. Durand, D. Moinier, A. Dolla, "Response of the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to oxidative conditions: proteome and transcript analysis," *Biochimie*, vol. 88, no. 1, pp. 85–94, Jan. 2006.
- [99] J. L. H. Busch, J. L. J. Breton, B. M. Bartlett, R. James, E. C. Hatchikian, A. J. Thomson, "recombinant 7Fe ferredoxin from *Desulfovibrio africanus*," *Spectroscopy*, vol. 71, pp. 63–71, 1996.
- [100] W. V. Sweeney, J. C. Rabinowitz, "Proteins containing 4Fe-4S," 1980.
- [101] S. J. Moore, M. J. Warren, "The anaerobic biosynthesis of vitamin B12.," *Biochemical Society transactions*, vol. 40, no. 3, pp. 581–6, Jun. 2012.